

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EXPRESSÃO E POSITIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO
CALBINDIN-D28K E TRPV6 E MORFOMETRIA DO SISTEMA DIGESTÓRIO E
REPRODUTOR DE CODORNAS DE POSTURA SUBMETIDAS A ESTRESSE
TÉRMICO E SUPLEMENTAÇÃO COM METIONINA**

Lanuza de Moraes Fernandes
Médica Veterinária

AREIA - PB

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EXPRESSÃO E POSITIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO
CALBINDIN-D28K E TRPV6 E MORFOMETRIA DO SISTEMA DIGESTÓRIO E
REPRODUTOR DE CODORNAS DE POSTURA SUBMETIDAS A ESTRESSE
TÉRMICO E SUPLEMENTAÇÃO COM METIONINA**

Lanuza de Moraes Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F363e Fernandes, Lanuza de Moraes.

Expressão e positividade dos transportadores de cálcio Calbindin-D28k e TRPV6 e morfometria do Sistema Digestório e Reprodutor de codornas de postura submetidas a estresse térmico e suplementação com metionina / Lanuza de Moraes Fernandes. - Areia, 2019.
74 f. : il.

Orientação: Ricardo Romão Guerra.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Nutrição de aves. 2. Absorção de cálcio. 3. Análise morfológica. 4. Saúde intestinal. I. Guerra, Ricardo Romão. II. Título.

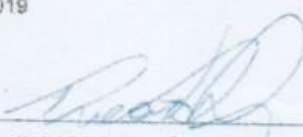
UFPB/CCA-AREIA

LANUZA DE MORAES FERNANDES

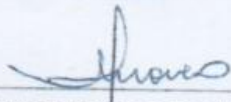
EXPRESSÃO E POSITIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE
CÁLCIO CALBINDIN-D28K E TRPV6 E MORFOMETRIA DO
SISTEMA DIGESTÓRIO E REPRODUTOR DE CODORNAS DE
POSTURA SUBMETIDAS A ESTRESSE TÉRMICO E
SUPLEMENTAÇÃO COM METIONINA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
Concentração Saúde Animal no Brejo
Paraibano.

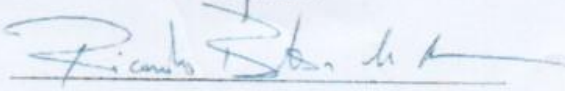
APROVADA EM 26/06/2019
BANCA EXAMINADORA



Dr. RICARDO ROMÃO GUERRA
UFPB
Orientador



Dr. MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA
Examinador



Dr. RICARDO BARBOSA DE LUCENA
Examinador

EPIGRAFE

“Não é a ausência de tempestades que nos distingue, e sim quem descobrimos em meio à tempestade: um Cristo imperturbado.”

Max Lucado

DEDICATÓRIA

*Aos meus filhos, mãe, marido e amigos que até aqui estiveram
ao meu lado, tornando-se as primordiais razões para nunca
desistir.*

AGRADECIMENTOS

Esse é o momento em que palavras jamais expressarão a gratidão que sinto dentro de mim, pela graça de estar finalizando mais uma etapa na minha vida acadêmica. Agradeço primeiramente a Deus, honra e louvor lhe seja dado por permitir que até aqui eu chegasse, e foi a sua presença que me fez enfrentar os obstáculos cotidianos, pois creio que Ele não nos prova além de nossas forças. Sou grata a minha família, minha mãe Genelva Moraes, meu marido Rivanio Fernandes e aos meus filhos Lukas e Miguel, estes são minha base, meu alicerce. Tornaram toda essa trajetória mais fácil e agradável, sempre me auxiliando no que era possível para tornar esse momento possível.

Agradeço ao orientador professor Ricardo Romão Guerra, pela paciência que teve comigo durante este processo, respeitou um dos momentos mais importantes da minha vida, que foi o nascimento do meu segundo filho, e mesmo com toda dificuldade e muitas vezes falta de disponibilidade da minha parte, me auxiliou possibilitando a conclusão do mestrado.

E o que falar das pessoas que Deus coloca em nossas vidas? Agradeço de coração e louvo ao Senhor pela vida de Clara Vasconcelos, uma das pessoas mais especiais e voluntárias que conheci em minha vida, tenho a plena certeza que ela foi a escolha de Deus para agregar paz e tranquilidade no meu dia-a-dia, porque nada como o seu: Mulheeeeer, vai dá tudo certo!!!

A professora Danila Barreiro Campos, que sempre esteve solícita em me ajudar. Que Deus possa abençoá-la ainda mais, a sua vida e a sua família.

E por fim, agradeço aos amigos que mesmo distantes pela correria do dia-a-dia, sempre estiveram comigo quando necessário. A Monalisa Farias, onde juntas iniciamos esta caminhada, onde juntas engravidamos, onde juntas retornamos... e que mesmo não nos vendo todos os dias agora nesse finalzinho, ainda assim ela é a amiga mais presente na distância. Por fim, só tenho gratidão por vocês, família e amigos. Muito amor por vocês!

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 - Dietas experimentais contendo três níveis de suplementação de Metionina para codornas de postura	44
Tabela 2 - Sequência de primers usados para o PCR quantitativo	48
Tabela 3 - Morfometria do sistema digestório e reprodutor de codornas japonesas (<i>Coturnix japonica</i>) de postura suplementadas (S) com metionina em níveis de 100%, 110% e 120% submetidas a diferentes temperaturas (20°, 24°, 28° e 32°C).....	49
Tabela 4 - Média do desempenho produtivo e espessura de casca de ovo de codornas em fase de postura submetidas à suplementação com metionina em 3 níveis (100, 110 e 120%) e 4 faixas de temperatura que variam da termoneutralidade ao estresse térmico.....	53
Tabela 5 - Resumo da Análise de Variância (Quadrados médios) para os efeitos de diferentes temperaturas e suplementação com metionina (100% e 120%) nas expressões dos genes <i>Calb 28</i> e <i>TRPV6</i> nos rim, intestino e útero de codornas japonesas (<i>Coturnix japonica</i>) em fase de produção	66

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1 – Fotomicrografias de imunoistoquímica a anti-calbindin-D28k em intestino de codornas de postura em diferentes aumentos. Observa-se o epitélio intestinal (setas) intensamente positivo ao anti-calbindin-D28k e células caliciformes (pontas de seta) não positivas (A e B). Observa-se também criptas (asterisco) não positivas ao anticorpo (C). Coloração cromógeno diaminobenzidina + hematoxilina.....56

Figura 2 – Fotomicrografia de imunoistoquímica a anti-calbindin-D28k em intestino de codornas de postura sob 28°C. Observa-se menor positividade epitelial quando comparado aos demais tratamentos de temperatura. Coloração cromógeno diaminobenzidina + hematoxilina.....57

Figura 3 – Fotomicrografias de imunoistoquímica a anti-calbindin-D28k em rim de codornas de postura em diferentes temperaturas. A) 20°C: A positividade se dá principalmente em túbulos contorcidos distais próximos á grandes vasos (asteriscos). B e C) 24 e 28°C: Menor positividade ao anticorpo. D) 32°C:Há mais túbulos contorcidos distais positivos e túbulos contorcidos proximais um pouco positivos também. Observa-se mais positividade (coloração marrom) nas temperaturas 20 e 32°C. Coloração cromógeno diaminobenzidina + hematoxilina. Aumento de 100x.....59

Figura 4 – Fotomicrografias de imunoistoquímica de anti-calbindin-D28k em rim de cordornas de postura em diferentes temperaturas. A) 24°C: Observar pouca positividade nos túbulos contorcidos distais (pontas de seta) e não positividade nos túbulos contorcidos proximais (asteriscos). B) 32°C: Em estresse térmico observa-se intensa positividade dos túbulos contorcidos distas (pontas de seta) e pouca intensidade nos túbulos contorcidos proximais (asteriscos). Coloração cromógeno diaminobenzidina + hematoxilina. Aumento de 400x.....60

Figura 5 – Fotomicrografias de imunoistoquímica a anti-calbindin-D28k em útero de codornas de postura em diferentes temperaturas (20, 24, 28 e 32°C) e suplementada com 120% de metionina em 32°C. A) 20°C: observar menor positividade nas glândulas uterínicas

(asterisco). B) 24°C: observar maior positividade nas glândulas uterínicas (asterisco). C) 28°C: observar maior positividade nas glândulas uterínicas (asterisco). D) 32°C: observar menor positividade nas glândulas uterínicas (asterisco). E) 32°C: suplementado com 120% de metionina. Observa-se mais positivo que o tratamento sem suplementação com metionina. Pontas de seta (epitélio uterínico), asteriscos (glândulas uterínicas). Coloração cromógeno DAB + hematoxilina. Aumento de 400x.....62

Figura 6 – Graficos dos efeitos da suplementação com metionina (100% e 120%) em diferentes temperaturas nas expressões dos genes *Calb 28* (A) e *TRPV6* (B) nos rins, *Calb 28* (C) e *TRPV6* (D) no intestino e *Calb 28* (E) e *TRPV6* (F) no útero de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) em fase de produção.....65

Figura 7 - Correlação de Pearson para as variações nas expressões dos genes *Calb 28* e *TRPV6* nos rim, intestino e útero de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) suplementadas com metionina (NRC 100% e 120%) em diferentes temperaturas em fase de produção.....67

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 1	18
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1 COTURNICULTURA DE POSTURA NO BRASIL.....	19
1.2 ABSORÇÃO DE CÁLCIO EM AVES DE POSTURA	20
1.3 TRPV6	22
1.4 CALBINDIN-D28K	23
1.5 ESTRESSE TÉRMICO E A SUPLEMENTAÇÃO COM METIONINA	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 2	38
RESUMO.....	39
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO	42
MATERIAL E MÉTODOS	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

EXPRESSÃO E POSITIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO CALBINDIN-D28K E TRPV6 E MORFOMETRIA DO SISTEMA DIGESTÓRIO E REPRODUTOR DE CODORNAS DE POSTURA SUBMETIDAS A ESTRESSE TÉRMICO E SUPLEMENTAÇÃO COM METIONINA

RESUMO GERAL – Objetivou-se através deste estudo verificar se a suplementação por metionina em situações de estresse térmico por altas temperaturas pode minimizar os efeitos deletérios na produção de ovos em codornas japonesas. Para tanto, foram utilizadas 504 codornas japonesas em fase de produção (segundo ciclo), distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4, sendo três níveis de metionina (100%, 110% e 120%) e quatro faixas de temperatura (20, 24, 28 e 32 °C). Foi avaliado pela primeira vez, através da positividade por imuno-histoquímica, e através da expressão gênica, por PCR real time, se os transportadores de cálcio, calbindin-D28k e TRPV6 que atuam na absorção, reabsorção e deposição no útero do cálcio, respectivamente em duodeno e jejuno, rim e útero seriam alterados diante tais condições (estresse térmico e suplementação com metionina). Foi visto que a suplementação com metionina em geral não aumenta a positividade ou expressão gênica de ambos os genes nos tecidos supracitados, não revertendo assim, os efeitos deletérios nos casos de estresse térmico. Exceção às glândulas uterínicas, as quais apresentaram na imunoistoquímica, uma maior positividade em animais suplementados nas temperaturas de 20 e 32°C, evidenciando o efeito positivo da suplementação para produção de tais aves, principalmente em temperatura já considerada de estresse térmico por calor, como a de 32°C anteriormente citada. Foi realizado, também pela primeira vez em codornas de postura sob estresse térmico e suplementadas com metionina, estudos morfométricos do sistema digestório (altura e largura de vilosidade, profundidade de cripta, relação vilo:cripta, área vilosidade, quantidade de células caliciformes, estoque de glicogênio hepático e de esteatose) e reprodutor (altura de dobras primárias uterínicas e quantidade de secundárias), os quais não apresentaram resultados significativos mediante a suplementação com metionina, uma vez que os resultados com significância foram obtidos em temperaturas termoneutras para as aves. Conclui-se que é justificável o uso da suplementação com metionina, com o objetivo de reversão dos efeitos deletérios sobre a produção de codornas de postura submetidas a estresse térmico, uma vez que houve alterações de calbindin e TRPV6 no magno e rim, locais de produção de casca de ovo e reabsorção de cálcio respectivamente, revertendo parte dos efeitos deletérios ocasionados pelo calor e assim propondo melhorias na qualidade e produção dessas aves.

Palavras-chave: Absorção de cálcio, análise morfológica, nutrição de aves, saúde intestinal.

CALBINDIN-D28K AND TRPV6 CALCIUM TRANSPORTERS EXPRESSION AND POSITIVITY AND MORPHOMETRY ON DIGESTION SYSTEM AND REPRODUCER OF POSTURE QUAILS SUBMITTED TO THERMAL STRESS AND METHINE SUPPLEMENT

GENERAL ABSTRACT- The objective of this study was to verify if methionine supplementation in high temperature heat stress situations can minimize the deleterious effects on egg production in Japanese quails. For this purpose, 504 Japanese quails in production phase (second cycle) were used, distributed in a completely randomized design in a 3x4 factorial scheme, with three levels of methionine (100%, 110% and 120%) and four temperature ranges (20, 24, 28 and 32°C). It was first evaluated by immunohistochemical positivity and gene expression by real time PCR whether the calcium transporters, calbindin-D28k and TRPV6 acting on calcium uterus absorption, resorption and deposition, respectively. in duodenum and jejunum, kidney and uterus would be changed under such conditions (heat stress and methionine supplementation). It has been seen that methionine supplementation generally does not increase the positivity or gene expression of both genes in the aforementioned tissues, thus not reversing the deleterious effects in cases of heat stress. Exception to the uterine glands, which presented in immunohistochemistry, a higher positivity in animals supplemented at temperatures of 20 and 32°C, evidencing the positive effect of supplementation for production of such birds, especially at temperature already considered heat thermal stress, such as that of 32°C previously mentioned. Morphometric studies of the digestive system (height and width of the villus, crypt depth, villus: crypt ratio, villus area, number of goblet cells, stock) were also performed for the first time in heat stress quail and methionine supplemented. hepatic glycogen and steatosis) and breeding (height of uterine primary folds and number of secondary folds), which did not present significant results upon methionine supplementation, since the significant results were obtained at thermoneutral temperatures for the birds. It is concluded that the use of methionine supplementation is justifiable, with the objective of reversing the deleterious effects on the production of laying quails subjected to thermal stress, as there were alterations of calbindin and TRPV6 in the magnesium and kidney, production sites. eggshell and calcium resorption respectively, reversing part of the deleterious effects caused by heat and thus proposing improvements in the quality and production of these birds.

Keywords: Calcium absorption, morphological analysis, bird nutrition, intestinal health.

INTRODUÇÃO

A avicultura de postura passou por diversas transformações nas últimas décadas, a partir do surgimento de linhagens mais produtivas, aperfeiçoamento de equipamentos e instalações, aplicação de técnicas de sanidade e prevenção de enfermidades e grandes avanços relacionados à nutrição e alimentação das aves. Este último é responsável por grande parte dos custos de produção na avicultura de postura, sendo o conhecimento das reais exigências nutricionais dos animais e os valores nutricionais dos alimentos extremamente necessário.

A coturnicultura visando à produção de ovos tem apresentado desenvolvimento bastante elevado, com a adequação as novas técnicas e tecnologias de produção, onde uma atividade tida como de subsistência passa a ocupar um cenário de atividade altamente tecnificada (PASTORE et al., 2012). Dentro da produção de ovos, um dos elementos mais relevantes é a absorção de cálcio. A mesma é essencial para formação da hidroxiapatita e mineralização dos ossos, além de satisfazer a alta demanda de cálcio no útero (formador da casca de ovos) para a mineralização do ovo em poedeiras (BIANCO et al., 2007; VAN DER EERDER et al., 2005).

A absorção epitelial de cálcio envolve duas vias distintas: o transporte ativo transcelular de cálcio e a difusão através da via paracelular. No intestino, o transporte transcelular de Ca^{2+} desempenha uma importante via para a homeostasia de cálcio, compreendendo a entrada passiva de cálcio pelo enterócito, via TRPV5 ou 6; a transferência citoplasmática do cálcio ligado a proteína calbindin-D9k, sendo que para aves a proteína análoga é a calbindin-D28k (BAR, 2008); e a extrusão do cálcio pela membrana basolateral. Um mecanismo similar existe em tecidos como rim, útero e placenta (BELKACEMI et al., 2005; HIRNET et al., 2003; HOENDEROP et al., 2005; KIM et al., 2006; SUZUKI et al., 2008; LEE & JEUNG, 2007). O rim também desempenha uma função essencial no balanço de cálcio regulando a excreção de cálcio do corpo, sendo o mesmo reabsorvido extensivamente no néfron em poedeiras para satisfazer o requerimento para a calcificação da casca do ovo (HOENDEROP et al., 2005; LAMBERS et al., 2006).

O canal de cálcio TRPV6 (transient receptor potencial vanilloid channel type 6) é descrito por exercer significativo efeito facilitador na entrada de cálcio em células epiteliais, existindo significativa correlação entre a expressão de TRPV6 e o transporte de cálcio (BROWN et al., 2005; BIANCO et al., 2007). Tal canal iônico é expresso nos epitélios de absorção e reabsorção, ou seja, no intestino e rim, entretanto, há pouca informação sobre o

padrão de expressão do TRPV6 em galinhas de postura (YANG et al., 2011). No único estudo sobre a presença de TRPV6 em poedeiras (YANG et al., 2011), observou-se positividade a anti-TRPV6 na borda apical das células do duodeno, jejuno, íleo, ceco e reto. Sendo a positividade mais alta no duodeno e mais fraca no reto, sendo ausente nas criptas e nas células caliciformes.

Outro transportador de cálcio, o calbindin (vitamin D- induced calcium-binding protein), se liga ao cálcio absorvido pela célula e o difunde pelo citoplasma, o qual é finalmente extrusado pelo CA^{2+} -ATPase na membrana basolateral, chegando ao sistema vascular através de vasos da lâmina própria (SUGIYAMA et al., 2007). A forma presente em aves é a com peso molecular de 28kDa, ou calbindin-D28k, presente no rim, cérebro e intestino e úteros de aves (BAR, 2008; FULLMER et al., 1976; PARMENTIER et al., 1990; FLEET & SCHOCH, 2010) e rim de mamíferos (FLEET & SCHOCH, 2010).

O conhecimento de que existe um requerimento crescente de cálcio na dieta após a maturação sexual em poedeiras é estabelecido. O mesmo é refletido na elevada expressão de calbindin-D28k nos enterócitos de poedeiras quando da produção de ovos (WU et al., 1993, 1994). A concentração de calbindin-D28k também estaria relacionada a quantidade de cálcio transportado para a casca do ovo no útero de poedeiras (CORRADINO et al., 1993), e tais níveis seriam induzidos pelo aumento do estrógeno. Sendo assim, a calbindin-D28k modularia a capacidade absorptiva intestinal de cálcio (SAKI & TIVEY, 1991) e de deposição do mesmo no útero (CORRADINO et al., 1993), influenciando na produção e na qualidade da casca do ovo. Assim como para TRPV6, não existem estudos de calbindin-D28k em codornas.

Como já citado, a coturnicultura vem crescendo principalmente na região do Nordeste do Brasil, a qual possui altas temperaturas em sua maior extensão. Tal característica pode prejudicar a produção das codornas de postura, uma vez que é sabido que o estresse por altas temperaturas afeta negativamente a performance das poedeiras, diminuindo o consumo, o ganho de peso vivo e a eficiência (DONKOH, 1989; SIEGEL, 1995), ainda aumenta a gordura celomática (McNAUGHTON et al., 1984), diminui o peso do ovo (PEGURI & COON, 1991; CARVALHO et al., 2012; BUNCHASAK & SILAPASORN, 2005), a produção de ovos e diminui a qualidade e a espessura da casca do ovo (DEATON et al., 1981; EMERY et al., 1984; CAMPOS, 2000; BUNCHASAK & SILAPASORN, 2005; MACK et al., 2013), sendo as últimas consequências advindas da diminuição da disponibilidade de íons de cálcio (MACK et al., 2013). Importante frisar que o aumento de cálcio na dieta não

melhora a qualidade da casca em condições de estresse por calor (de ANDRADE et al., 1977; TANOR et al., 1984). Em adição, diminui a presença de calbindin-D28k no íleo, ceco, cólon, e útero de aves, causando deterioração da qualidade da casca do ovo sob essa condição (EBEID et al., 2012). De fato, a exigência de cálcio para poedeiras aumenta com altas temperaturas ambientais (PLAVNIK, 2003). Uma vez que os níveis de calbindin-D28k diminuem em casos de estresse térmico, espera-se que o mesmo ocorra com os de TRPV6. Tais eventos poderiam justificar fisiologicamente a menor produção e qualidade de ovos nessas condições.

Visando buscar metodologias e tratamentos que possam minimizar os efeitos deletérios do estresse térmico sob a produção de ovos na avicultura comercial, a suplementação com metionina, primeiro aminoácido limitante para aves, fundamental para o desenvolvimento corporal e reprodutivo de galinhas poedeiras, parece ser umas dessas alternativas. Um estudo com suplementação de metionina em dietas com menores níveis de proteína na Tailândia, país com semelhanças térmicas às do Nordeste brasileiro, demonstrou melhorias nos índices de produção em poedeiras (BUNCHASAK & SILAPASORN, 2005). Resultados como aumento de 10% da massa do ovo (SUMMERS et al., 1991; HARM & RUSSELL, 1993), diminuição da gordura em poedeiras (BUNCHASAK et al., 1997) e aumento de espessura de casca de ovo (BUNCHASAK & SILAPASORN, 2005) também foram observadas com a suplementação de metionina.

Apesar de já existirem estudos envolvendo a suplementação por metionina, apenas restritos estudos (SANTANA, 2014), exaltam alterações morfológicas proporcionadas pelos tratamentos, assim como, as respostas fisiológicas. A maioria se concentra apenas em verificar os índices de desempenho zootécnico nas poedeiras. Se valendo dessa lacuna no conhecimento, mais estudos são necessários para avaliar a suplementação da dieta de codornas de postura com metionina no nordeste brasileiro, correlacionando os índices zootécnicos com a morfologia do sistema digestório e reprodutor, em condições de estresse térmico.

Sendo assim, o presente estudo visa gerar subsídios para o aprofundamento dos estudos com transportadores de cálcio epiteliais, com análises morfológicas e análises morfométricas na avicultura, os quais ainda são insipientes; além de testar os efeitos da suplementação com metionina em codornas de postura sob estresse térmico por altas temperaturas, verificando não apenas os índices zootécnicos, mas também se há alteração na expressão (RNAm) e positividade (proteína) desses transportadores (calbindin-D28k, e

TRPV6) nos tecidos de absorção (duodeno e jejuno), reabsorção (rim) e de deposição de cálcio (útero).

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 COTURNICULTURA DE POSTURA NO BRASIL

No final da década de 50 as codornas foram introduzidas no Brasil através de imigrantes italiano e japoneses, e atualmente cresce destacando-se no mercado agropecuário, visando principalmente a produção de ovos (BERTECHINI, 2013). O ovo de codorna é uma fonte confiável de proteínas, lipídeos, aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais, se tornando um alimento completo e equilibrado (SEIBEL et al., 2010).

Por muito tempo a coturnicultura foi vista apenas como subsistência, sendo assim uma atividade de pequenos e médios produtores (FAITARONE et al., 2005; PIZZOLANTE et al., 2011; BERTECHINI, 2013), entretanto ao longo dos últimos anos se tornou uma atividade economicamente rentável e de consistente crescimento, por apresentar vantagens como precocidade sexual, com início da postura entre 35 a 40 dias e alta produtividade com produção média de 300 ovos/ave/ano (ALBINO & BARRETO, 2003), além de exigir pouco espaço para produção se comparado com outras criações convencionais (BERTECHINI, 2010; PIZZOLANTE et al., 2011; SANTOS, 2014).

Segundo Bertechini (2013) o Brasil lidera a produção de ovos de codornas japonesas na América do Sul, e mundialmente se encontra na terceira posição do ranking. Além disso, é possível observar que a coturnicultura de postura segue ligada aos polos de produção de ovos de galinha, resultado do aproveitamento do know-how pelos produtores, abrindo novos mercados e possibilitando a exploração de mais de uma atividade.

Tratando-se de uma exploração comercial em expansão, alguns estudos referentes a coturnicultura de postura necessitam de atualizações, visto que as dietas para as codornas no Brasil ou em outros países de clima tropical são formuladas com base em tabelas estrangeiras, baseando-se em 8 tabelas de exigências nutricionais como o National Research Council – NRC (1994) e o Institut National de La Recherche Agronomique – INRA (1999), ou seja, são feitas com base em níveis nutricionais presentes em tabelas de exigências nutricionais de poedeiras e de frangos de corte, tornando as dietas frequentemente com excesso ou deficiência de algum nutriente.

Assim, é de suma importância o crescimento de estudos destinados a área de nutrição de codornas de postura, uma vez que os recentes aumentos nos custos de produção, principalmente dos ingredientes utilizados na alimentação de aves, demandam a adoção de

estratégias nutricionais que proporcionem melhor aproveitamento dos nutrientes, com consequente melhoria da eficiência produtiva (COSTA et al., 2012).

1.2 ABSORÇÃO DE CÁLCIO EM AVES DE POSTURA

Os minerais constituem parte importante do organismo dos animais, representando cerca de 3 a 4% de peso vivo das aves, os mesmos desenvolvem funções que além da manutenção da vida, estão relacionadas com o crescimento e reprodução dos animais, onde através de vias metabólicas auxiliam no aumento da produtividade do animal (PINTO et al., 2012).

O cálcio por sua vez está presente em 1,5 a 2% do peso corporal, entretanto sua maior parte (99%) encontra-se na forma de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ nos ossos (BERTECHINI, 2014). Os outros 1% está distribuído em tecidos moles e exerce funções variadas, tais como ativador de enzimas, no processo de coagulação sanguínea e transmissão de estímulos nervosos (ADEDOKUN; ADEOLA, 2013; BERTECHINI, 2014).

Segundo Nunes et al., (2006), a utilização do cálcio vai estar relacionada principalmente com a idade da ave. Aves em crescimento, o cálcio é utilizado na formação óssea, enquanto que nas aves em idade de postura, sua utilização prioriza a formação da casca do ovo. Assim, o cálcio é elemento fundamental para manutenção da produção de ovos (SCHERER et al., 2004).

A maior fonte de cálcio vem da absorção da dieta a nível de intestino, reabsorção renal e dos estoques dos ossos (MILLER, 1992; SUGIYAMA & KUSUHARA, 2001; SUGIYAMA et al., 2007). Para manter o equilíbrio orgânico, em situações de baixa concentração sanguínea, ocorre a mobilização do cálcio dos ossos para o sangue. A mobilização do cálcio depositado nos ossos é feita por dois mecanismos. O primeiro é a transferência dos íons dos cristais de hidroxiapatita para o líquido intersticial, do qual o cálcio passa para o sangue; e o segundo mecanismo, sendo de ação lenta, é devido à ação do hormônio paratormônio (PTH) no tecido ósseo. A secreção do paratormônio é regulada em resposta a flutuações na concentração de cálcio (CROSS & PETERLIK, 1988).

A calcitonina, produzida pelas células parafoliculares da tireóide, é outro hormônio que atua no metabolismo do cálcio para manter normal o seu nível no plasma, agindo na inibição da reabsorção da matriz óssea e, portanto, a mobilização do cálcio. O estímulo para sua secreção é dado quando os níveis de cálcio estão elevados no sangue (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

De acordo com Bronner (2003) e Van Abel et al., (2005) a absorção epitelial de cálcio envolve duas vias distintas: o transporte ativo transcelular de cálcio e a difusão através da via paracelular. No intestino de mamíferos, o transporte transcelular de cálcio desempenha uma importante via para a homeostasia de cálcio, o qual é um processo de três passos, compreendendo a entrada passiva de cálcio pelo enterócito, via TRPV5 ou 6; a transferência citoplasmática do cálcio ligado a proteína calbindin-D9k; sendo que para aves a proteína análoga é a calbindin-D28k (BAR, 2008); e a extrusão do cálcio pela membrana basolateral via Ca^{2+} –ATPase (PMCA 1b) e/ou Na – Ca trocador.

Um mecanismo similar existe em tecidos como rim, útero e placenta (BELKACEMI et al., 2005; HIRNET et al., 2003; HOENDEROP et al., 2005; KIM et al., 2006; SUZUKI et al., 2008; LEE & JEUNG, 2007).

O rim também desempenha uma função essencial no balanço de cálcio regulando a excreção de cálcio do corpo. Para satisfazer o requerimento para a calcificação da casca do ovo, o cálcio filtrado no glomérulo é extensivamente reabsorvido quando passa pelos néfrons (HOENDEROP et al., 2005; LAMBERS et al., 2006).

Mello (2015) afirma que aproximadamente 30% do Ca para a formação a casca do ovo, é proveniente dos ossos, isso ocorre pelo fato do útero, local onde ocorre a deposição de carbonato de Ca no ovo, não estocar Ca, significando que a fração organiza da casca é sintetizada por glândulas e o Ca mobilizado do sangue, através do plasma para o útero. Ainda para formação da casca há Ca proveniente da absorção intestinal o qual é transportado através do sangue até a luz da câmara calcígena (CARVALHO; FERNANDES, 2013). A anidrase carbônica, enzima chave na formação da casca de ovos, é a responsável por este transporte (PERSSON, 2009; SCOTTÁ et al. 2014).

A função dos diferentes tipos celulares do útero e das glândulas tubulares não estão claramente definidas, mas estão implicadas no processo de secreção de cálcio. Alta concentração de cálcio-ativado ATPase é localizado principalmente nas microvilosidades das células das glândulas tubulares do útero (YAMAMOTO, 1985). Apesar da via de absorção e reabsorção de cálcio ser fisiologicamente conhecida, não há estudos que visem a elucidação da absorção, reabsorção e deposição de cálcio no útero, incluindo seus sítios e expressão, em codornas, sendo também escassos na avicultura de forma geral.

A literatura (YANG et al., 2011) também propõe que os canais epeliais TRPV6 e 5 tem uma função crucial na absorção e reabsorção respectivamente, de cálcio em poedeiras,

porém, mais estudos são necessários para elucidar sua atuação, principalmente no útero e rim, sendo ainda, inexistentes estudos de tais transportadores de cálcio em codornas.

1.3 TRPV6

De acordo com Nijenhuis et al. (2003) e Hoenderop et al. (2005), o canal iônico TRPV6 (transient receptor potencial vanilloid channel type 6) funciona como um canal epitelial de cálcio em intestino, rim, osso, pele, placenta e glândulas exócrinas de mamíferos, todas nas quais são caracterizadas pela alta demanda por transporte de cálcio. É descrito por exercer significativo efeito facilitador na entrada de células epiteliais, apresentando correlação entre a expressão do TRPV6 e o transporte de cálcio, sob a influência de um gradiente eletroquímico que o atrai para dentro da célula (HOENDEROP et al., 2005), sendo um canal iônico dependente da vitamina D (BAR, 2008). Tal característica foi evidenciada em camundongos TRPV^{-/-}, que apresentaram mal absorção intestinal de cálcio e desordens em sua reabsorção (CUI et al., 2012). Hoenderop et al. (2005), também afirma que baixos níveis de vitamina D na dieta, também resultaram em prejuízos consistentes ao TRPV6. Tais observações levaram a sugestão de que a TRPV6 é um importante limitador na entrada e homeostasia de cálcio (BIANCO et al., 2004; BIANCO et al., 2007).

Tal canal iônico é expresso nos epitélios de absorção e reabsorção, ou seja, no intestino e rim, entretanto há pouca informação sobre o padrão de expressão do TRPV6 em galinhas de postura (YANG et al., 2011) e nenhuma para codornas em postura.

Estudo com imuno-histoquímica indicou positividade a anti-TRPV6 na borda apical das células do duodeno, jejuno, íleo, ceco e reto. Sendo a positividade mais alta no duodeno e mais fraca no reto, sendo ausente nas criptas e nas células caliciformes. PCR e Western blot também demonstrou a presença do TRPV6 nos segmentos supracitados, principalmente no duodeno e jejuno de poedeiras (YANG et al., 2011). Esse achado é consistente, uma vez que os principais sítios de absorção de cálcio em aves é o duodeno e jejuno (HURWITZ et al., 1967).

A presença significativa de TRPV6 (RNAm e proteína) no íleo de poedeiras (YANG et al., 2011), contrasta com o encontrado em ratos, humanos e ovelhas (PENG et al., 2000; NIJENHUIS et al., 2003; WILKENS et al., 2009), sugerindo que o íleo também deve ter uma função significativa na absorção intestinal em poedeiras.

No rim de poedeiras, o TRPV6 (proteína) é positivo na borda apical dos túbulos contorcidos proximais, alças de Henle e túbulos contorcido distais, entretanto, mais fraca do

que no sistema digestório. Positividade não é encontrada no glomérulo renal e nos ductos coletores. A expressão gênica para o mesmo demonstrou ser muito mais baixa do que no duodeno, suportando indiretamente a hipótese de que o TRPV5, um homólogo renal do TRPV6, deve ser o principal canal de cálcio responsável pelo transporte transcelular de cálcio no sistema excretor urinário de aves (YANG et al., 2011). Corroborando, a expressão relativa de TRPV5 no rim de mamíferos é 100 vezes maior do que a de TRPV6 (VAN ABEL et al., 2005). Entretanto, segundo Yang et al. (2005), mais estudos precisam ser realizados para afirmar que TRPV5 está realmente envolvido na reabsorção de cálcio em poedeiras.

Apesar do estudo citado (YANG et al., 2011), para outros autores (BAR, 2008; WASSERMAN & TALYOR, 1966; QIN & KLANDORF, 1991a,b) no entanto, a presença de TRPV6 em tecidos de aves, incluindo poedeiras ou codornas, ainda é incerta. Uma vez que o TRPV6 é expresso nos segmentos intestinais de poedeiras, sua absorção de cálcio deve exercer significativa função na produção de ovos durante o pico da postura, incluindo a produção da casca, no útero. Tais observações vem de encontro com Yang et al. (2011), os quais descrevem áreas para futuros estudos abrangendo os mecanismos de transferência de cálcio em poedeiras.

1.4 Calbindin-D28k

Como já descrito no item 1.2 dessa revisão de literatura, a absorção passiva do cálcio envolve difusão de cálcio do lúmen intestinal para o enterócito, enquanto a absorção ativa é o processo na qual o cálcio passa por canais encontrados na membrana apical das microvilosidades do enterócitos. Esses então se ligam a uma proteína que se liga ao cálcio, a Calbindin (vitamin D- induced calcium-binding protein), e o difunde pelo citoplasma, o qual é finalmente extrusada pelo CA^{2+} -ATPase na membrana basolateral, chegando ao sistema vascular através de vasos da lâmina própria (SUGIYAMA et al., 2007). Existem duas subclasses de calbindina: a proteína de aproximadamente 28.000 peso molecular (calbindina D-28k) e a proteína de aproximadamente 9.000 peso molecular (calbindina D-9k) (CHRISTAKOS et al., 2011).

A calbindina D-28k está presente em altas concentrações no rim, cérebro, intestino e úteros de aves (BAR, 2008; FLEET & SCHUCH, 2010) e rim de mamíferos (FLEET & SCHUCH, 2010). A presença do calbindin no citoplasma é significativa para o potencial de absorção ativa de cálcio (MORRISSEY & WASSERMAN, 1971), sendo sua biossíntese

dependente dos níveis circulatórios da vitamina D (STRIEM; BAR, 1991; WU et al., 1993), e da atividade da Ca^{2+} -ATPase na membrana basolateral (CAI et al., 1993), sendo a maioria do cálcio dietético sendo absorvido pelos segmentos intestinais pela via ativa (McCORMICK, 2002).

Segundo Christakos et al. (2011) esse transportador de cálcio está localizado no intestino das aves, principalmente no citoplasma das células absorptivas. Já nos rins, foi reportado em estudos imunocitoquímicos que a localização da calbindina D-28k é, exclusivamente, no néfron distal nas aves. A calbindina D-28k ainda se encontra presente na placa de crescimento da cartilagem (osso), na glândula da casca do ovo e nos tecidos reprodutivos das aves.

No intestino de poedeiras, há positividade (proteína) de calbindin-D28k em todos os segmentos, sendo maior no duodeno e jejuno, principalmente nas porções apicais das vilosidades (WU et al., 1993; SUGIYAMA et al., 2007), e menor em íleo. A positividade também ocorre no ceco e cólon, em menor intensidade, o que indica que as poedeiras absorvem cálcio tanto no intestino delgado quanto no grosso (SUGIYAMA et al., 2007).

O conhecimento de que existe um requerimento crescente de cálcio na dieta após a maturação sexual em poedeiras é estabelecido. Ao aproximar-se a maturidade sexual, a ave inicia um processo de mudança que permite a formação de ovos, sendo necessária reserva de Ca nos ossos. O começo da ovulação em poedeiras está associado com um aumento da absorção de Ca e por elevadas concentrações de calbindina D28k, o que coincide com aumento nas concentrações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. A calbindina D28k tem um sinergismo com esteróides sexuais (estrógeno), relacionado com o crescimento e a maturação do oviduto (SILVA, 2014). Os níveis de calbindina também oscilam de acordo com o nível de produção das poedeiras, onde aves em pico de produção apresentam altos níveis do transportador, porém, aves em período de muda apresentam um decréscimo nesses níveis, retornando ao normal assim que a ave retorna a postura (YOSEFI et al., 2003 citado por BAR, 2009). Sendo assim, a calbindin-D28k modularia a capacidade absorptiva intestinal de cálcio (SAKI & TIVEY, 1997) e de deposição do mesmo no útero (CORRADINO et al., 1993), influenciando na produção e na qualidade da casca do ovo.

Apesar do modelo de atuação da calbindin-D28k demonstrado no estudo supracitado em poedeiras, ainda não se sabe como a mesma se dá em outras espécies de postura como por exemplo codornas, cultura que vem crescendo na região Nordeste do Brasil (PASTORE et al., 2012).

O estresse por calor é responsável pela redução da conversão de vitamina D3 em sua forma metabolicamente ativa, a 1,25(OH)2D3, que é essencial para a absorção e a utilização de cálcio. De fato, a exigência de cálcio para poedeiras aumenta com altas temperaturas ambientais (PLAVNIK, 2003). Essa afirmativa pode justificar a diminuição da presença de calbindin-D28k no íleo, ceco, cólon e útero de aves, submetidas a estresse por altas temperaturas (30-33°C), ocasionando deterioração da qualidade da casca do ovo sobre essa condição (EBEID et al., 2012).

1.5 ESTRESSE TÉRMICO E A SUPLEMENTAÇÃO COM METIONINA

No Brasil vem ocorrendo um acentuado crescimento na exploração de codornas, e a região Nordeste ganha destaque significativo no que se diz respeito à produção de ovos. A região semiárida apresenta elevadas temperaturas, com estações climáticas bem definidas, uma estação seca, com altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar (50-70%), e outra estação chuvosa, com temperaturas amenas caracterizadas por umidade relativa do ar mais elevada (SILVA et al., 2012).

Contudo, predominam as altas temperaturas durante todo o ano, e diante disto, o estresse térmico é particularmente um grande problema. Como é sabido, altas temperaturas afetam negativamente a performance das poedeiras, diminuindo o consumo, o ganho de peso vivo e a eficiência (DONKOH, 1989; SIEGEL, 1995), ainda aumenta a gordura celomática (McNAUGHTON et al., 1984), diminui o peso do ovo (PEGURI & COON, 1991; BUNCHASAK & SILAPASORN, 2005), a produção de ovos (MACK et al., 2013) e diminui a qualidade da casca do ovo (DEATON et al., 1981; EMERY et al., 1984; BUNCHASAK & SILAPASORN, 2005; MACK et al., 2013), sendo as últimas consequências advindas da diminuição da disponibilidade de íons de cálcio (MACK et al., 2013).

Alguns autores confirmam que para codornas japonesas na fase produtiva, a temperatura de 27°C (VERCESE et al., 2012) e 28°C (CASTRO, 2014) foram consideradas o limite a partir do qual as aves reduziram o consumo de ração e ocorreu as perdas na qualidade dos ovos, indicando os efeitos do estresse por calor. O mesmo autor relatou que a temperatura de 20°C deu início ao aparecimento dos sinais de estresse por frio.

Aves submetidas ao estresse por calor apresentam uma preferência pelo metabolismo de glicose, então como medida potencial para aliviar os efeitos desse estresse é realizada a suplementação das rações com glicose ou uma fonte de carboidrato que possibilite a

disponibilização mais rápida destes açúcares, ou então, utiliza-se a suplementação dos aminoácidos glicogênicos, como metionina, cistina, e outros, que seriam utilizados para evitar a catabolização do tecido muscular para produção de glicose a partir dos aminoácidos (VIRDEN E KIDD, 2009).

A metionina, é essencial para todas as espécies animais (D'MELLO, 2003), sendo classificada como aminoácido essencial. O mesmo é o primeiro limitante na alimentação de aves e, quando em baixas concentrações, podem limitar o desenvolvimento animal. É sabido que o nível ótimo de metionina para aves depende da espécie, estágio, condições do meio ambiente, e nível de energia na ração (MAROUFYAN et al., 2010).

A metionina desempenha várias funções no organismo das aves e tem efeito no sistema imune (KALINOWSKI et al., 2003), na deposição de proteína (HRUBY, 1998), no metabolismo de lipídeos (JENSEN, 1990) e no metabolismo energético (BOOMGARDT & BAKER, 1973); quando da suplementação na dieta, a metionina também pode interferir de maneira significativa na produção e na qualidade dos ovos em poedeiras. A suplementação de dietas com baixa proteína com suplementação de metionina resulta em aumento da massa do ovo em 10% (SUMMERS et al., 1991; HARM & RUSSELL, 1993), diminuição da gordura de poedeiras (BUNCHASAKLANCO et al., 1997) e a espessura da casca do ovo aumenta (BUNCHASAK & SILAPASORN, 2005).

O primeiro fator restritivo para a formação da casca do ovo é o cálcio, e tal fator é influenciado diretamente pela elevação da temperatura, dificultando a troca de calor nas aves, uma vez que não dispõem de glândulas sudoríparas, e apresentam o corpo recoberto por penas, tendo o propósito de tentar manter sua temperatura corporal em equilíbrio. As aves aumentam a frequência respiratória, possibilitando a troca de calor com o ambiente, tal processo interfere em muitos processos naturais como a eliminação do CO₂, que acarreta a diminuição e disponibilidade de bicarbonatos (HCO₃) utilizados na formação da casca do ovo, comprometendo a formação da mesma. Em altas temperaturas, a qualidade da casca também pode ser reduzida devido a menor atividade da anidrase carbônica (enzima que tem um papel importante no transporte do CO₂ e no controle do pH do sangue) (ALBINO et al. 2014). Entretanto, o aumento de cálcio na dieta não melhora a qualidade da casca em condições de estresse por calor (DE ANDRADE et al., 1977; TANOR et al., 1984).

Para a suplementação com metionina, além das respostas produtivas em poedeiras, foi descrito alterações morfológicas nos sistema digestório e reprodutor que proporcionaram e justificaram a melhoria nos índices zootécnicos. Alterações na altura de vilosidade intestinal,

cripta, relação vilo:cripta, quantidade de células caliciformes no duodeno, na deposição de glicogênio hepático, na intensidade de esteatose hepática, na ramificação das dobras do magno, na quantidade e desenvolvimento de glândulas do magno e quantidade e altura de dobras no útero foram observadas quando da suplementação de metionina em poedeiras, frango de corte e aves leves em estudos realizados por nosso grupo (JUNIOR, 2013; LOPES, 2014; PINHEIRO, 2014; SANTANA, 2014). Tais análises morfológicas, quantitativa e qualitativa, abrem perspectiva para justificar morfofisiologicamente índices zootécnicos alcançados por determinados tratamentos e dietas, apesar de ainda serem poucos explorados pela comunidade científica.

Sendo assim, adicionar metionina em dietas com proteína reduzida deve ser vantajoso para a qualidade de casca de ovo sob condições de estresse térmico por altas temperaturas (BUNCHASAK & SILAPASORN, 2005). Segundo Barbosa et al. (2009), os aminoácidos sulfurados têm grande importância sobre o tamanho e o peso dos ovos. Corroborando essa ideia, Pavan et al. (2005) utilizaram três níveis de proteína bruta (14, 15,5 e 17%) e de aminoácidos sulfurados (0,57, 0,64 e 0,71%) e constataram que o peso do ovo e a porcentagem de albúmen aumentaram com a elevação dos níveis de metionina + cistina, entretanto, estudos com codornas de postura ainda são insipientes.

A suplementação por metionina também reduz a mortalidade, reduz o peso do fígado, com decréscimo da proteína hepática e aumenta gordura hepática (BUNCHASAK & SILAPASORN, 2005). As razões para essas alterações deve ser o aumento da utilização da energia corpórea (BRODY, 1994) e a estimulação de síntese de ácidos graxos no fígado (SMITH et al., 1993). O aumento da gordura no fígado também deve ocorrer pelo efeito da alta síntese de estrógeno no ovário para suportar a maior produção de ovos (BUNCHASAK & SILAPASORN, 2005). A síndrome do fígado gordo, ou esteatose, é uma condição que atinge principalmente as poedeiras. A causa básica é a excessiva ingestão de dietas ricas em energia (BUNCHASAK & SILAPASORN, 2005).

Outros estudos envolvendo a suplementação da dieta com metionina já vem sendo estudados em poedeiras. Ali & Al-Mayah et al. (2006), por exemplo, usou 1 gm/kg ou 1 gm/l na água de beber; Halder et al. (2007) adicionou 50 g de metionina por 100kg de ração e Santana (2014) utilizou 80, 90, 100, 110 e 120% das recomendações do NRC (1994) para metionina, entretanto, tais estudos, a exceção de Santana (2014), se concentram apenas em verificar os índices de desempenho zootécnicos nas poedeiras, não exaltando as alterações morfológicas proporcionadas pelos tratamentos. Portanto mais estudos são necessários para

avaliar a suplementação da dieta de aves com metionina no nordeste brasileiro, correlacionando os índices zootécnicos das aves com as características morfológicas do sistema digestório e reprodutor como outras respostas fisiológicas, em condições de estresse térmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEDOKUN, S. A.; ADEOLA, O. Calcium and phosphorus digestibility: metabolic limits. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 600-608, 2013.

ALBINO, L.F.T.; BARRETO, S.L.T. **Codornas: criação de codornas para produção de ovos e carne**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2003. 289p.

ALBINO, L. F. T.; CARVALHO, B. R.; MAIA, R. C.; BARROS, V. R. S. M. **Galinhas Poedeiras: Criação e Alimentação**. Viçosa, Minas Gerais: Aprenda Fácil, 2014. 376p.

AL-MAYYAH, Ali AS. Resposta imune de pintos de corte à suplementação de DL-metionina em diferentes idades. **Revista Internacional de Ciência Avícola** , v. 5, n. 2, p. 169-172, 2006.

BAR, A., 2008. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation. **Comp. Biochem. Physiol.** 152, 447–469.

BAR, Arie. Differential regulation of calbindin in the calcium-transporting organs of birds with high calcium requirements. **The journal of poultry science**, v. 46, n. 4, p. 267-285, 2009.

BELKACEMI, L., BEDARD, I., SIMONEAU, L., LAFOND, J., 2005. Calcium channels, transporters and exchangers in placenta. **Cell Calcium** 37, 1–8.

BERTECHINI, A. G. Exigências de minerais para aves. In: SAKOMURA, N. K.; SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K.; HAUSCHILD, L. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2014. P. 375-388.

BERTECHINI, A.G. Situação Atual e Perspectivas Para a Coturnicultura no Brasil. In: IV Simpósio Internacional e III Congresso Brasileiro de Coturnicultura. Lavras: **Anais...** Lavras - MG, 2010.

BERTECHINI, A. G. Situação atual e perspectivas da coturnicultura industrial. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL, 5.; CONGRESSO BRASILEIRO DE COTURNICULTURA, 4., 2013, Lavras. **Anais...** Lavras, MG: [UFLA], 2013.

BIANCO, S.D., PENG, J.B., TAKANAGA, H., KOS, C.H., CRESCENZI, A., BROWN, E.M., HEDIGER, M.A., 2004. Mice lacking the epithelial calcium channel CaT1 (TRPV6) show a deficiency in intestinal calcium absorption despite high plasma levels of 1,25-dihydroxy vitamin D. **FASEB J** 18, A706.

BIANCO, Suzy DC et al. Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene. **Journal of bone and mineral research**, v. 22, n. 2, p. 274-285, 2007.

BOOMGARDT, J.; BAKER, D. H. Effect of dietary energy concentration on sulfur amino acid requirement and body composition of young chicks. **Journal of Animal Science**, v. 36, p. 307-311, 1973.

BRODY, T., 1994. **Nutritional biochemistry**. Academic Press, Inc., USA, 658 p.

BRONNER, F. Vitamin D-dependent active calcium transport: the role of CaBP. **Calcified tissue international**, v. 43, n. 3, p. 133, 1988.

BROWN, A.J., KRITS, I., ARMBRECHT, H.J., 2005. Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 437, 51–58.

BUNCHASAK, C. et al. The effects of supplementing methionine plus cystine to a low-protein diet on the growth performance and fat accumulation of growing broiler chicks. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 10, n. 2, p. 185-191, 1997.

BUNCHASAK C., SILAPASORN T. Effects of adding methionine in low-protein diet on production performance, reproductive organs and chemical liver composition of laying hens under tropical conditions. **International Journal of Poultry Science**, 4 (5): 301-308, 2005.

BUNCHASAK, C. et al. The effects of supplementing methionine plus cystine to a low-protein diet on the growth performance and fat accumulation of growing broiler chicks. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 10, n. 2, p. 185-191, 1997.

CAI Q, CHANDLER JS, WASSERMAN RH, KUMAR R, PENNISTON JT. Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Feb 15.1993 90:1345–1349.

CARVALHO, L.S.S. Nutrição de poedeiras em clima quente. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano 9, n.18, 2012.

CARVALHO, L. S. S.; FERNANDES, E. A. Formação e qualidade da casca de ovos de reprodutoras e poedeiras comerciais. **Medicina Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 35-44, 2013.

CASTRO, J.O. **Avaliação e modelagem do desempenho de codornas japonesas em postura submetidas a diferentes ambientes térmicos**. 2014. 71f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Viçosa, MG, 2014.

CHRISTAKOS, S.; MADY, L.J.; DHAWAN, P. The calbindins: Calbindin D-28k and calbindin D-9k and the epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6. In: FELDMAN, D., PIKE, J.W., ADAMS, J.S. **Vitamin D**. 3 ed. Academic Press, 2011, p.363-379.

CORRADINO RA, SMITH CA, KROOK LP, FULLMER CS. Tissue-specific regulation of shell gland calbindin D28K biosynthesis by estradiol in precociously matured, vitamin D-depleted chicks. **Endocrinology**. 132(1):193-8, 1993.

CROSS, Heide S.; PETERLIK, Meinrad. Calcium and inorganic phosphate transport in embryonic chick intestine: triiodothyronine enhances the genomic action of 1, 25-dihydroxycholecalciferol. **The Journal of Nutrition**, v. 118, n. 12, p. 1529-1534, 1988.

CUI, M.; LI, Q.; JOHNSON, R.; FLEET, J.C. Villin Promoter-Mediated Transgenic Expression of TRPV6 Increases Intestinal Calcium Absorption in Wild-type and VDR Knockout Mice. **J Bone Miner Res**. 27(10): 2097–2107, 2012.

DE ANDRADE, A.N, J.C. ROGLER, W.R. FEATHERSTON, C.W. ALLISTON, 1977. Interrelationships between diet and elevated temperatures (cyclic and constant) on egg production and sheel quality. **Poult. Sci.**, 56: 1178-1188.

DEATON, J.W., F.N. REECE, J.L. MCNAUGHTON, B.D. LOTT, 1981. Effect of differing temperature cycles on egg shell quality an layer performance. **Poult. Sci.**, 60: 733-737.

DONKOH, A., 1989. Ambient temperature: a factor affcting perfomance and pysiological response of broiler chickers. **Int. J. Biometorol.**, 33: 259-265.

D'MELLO. J. P. F. **Amino Acids in Animal Nutrition**. Formerly of the Scottish Agricultural College Edinburgh, 2^a ed. p. 143, UK, 2003.

EBEID TA, SUZUKI T, SUGIYAMA T. High ambient temperature influences eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments of laying hens. **Poult Sci.** 91(9):2282-7, 2012.

EMERY, D.A, D. VOHRA, R.A. ERNST, 1984. The effect of cycle and constant ambient temperature on feed consumption, egg production, egg weight, and shell thickness of hens. **Poult. Sci.**, 63: 2027-2035.

FLEET, James C.; SCHOCH, Ryan D. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 47, n. 4, p. 181-195, 2010.

HALDER G., MONDAL S., PAUL S.K., ROY B., SAMANTA G. Chronic arsenic toxicity with and without excess supplementation of methionine on the performance and metabolizability of nutrients in layer chicken. **Asian Journal of Animal Sciences** 1 (1): 18-25, 2007.

HARM, R.H.; G.B RUSSELL, 1993. Optimizing egg mass with amino acid supplementation of a low-protein diet. **Poult. Sci.**, 72: 1892-1896.

HIRNET, D., OLAUSSON, J., FECHER-TROST, C., BÖDDING, M., NASTAINCZYK, W., WISSENBAACH, U., FLOCKERZI, V., FREICHEL, M., 2003. The TRPV6 gene, cDNA and protein. **Cell Calcium** 33, 509–518.

HOENDEROP, Joost GJ; NILIUS, Bernd; BINDELS, René JM. Calcium absorption across epithelia. **Physiological reviews**, v. 85, n. 1, p. 373-422, 2005.

HRUBY, M. **The amino acid maintenance and growth requirements of male broilers**. 1998. 144f. Thesis (Ph.D. in Animal Science) - University of Minnesota, Minnesota, 1998.

HURWITZ, S.; HARRISON, H. C.; HARRISON, H. E. Effect of vitamin D3 on the in vitro transport of calcium by the chick intestine. **The Journal of nutrition**, v. 91, n. 3_suppl, p. 319-323, 1967.

JENSEN, L.S. Concepts of amino acid and protein nutrition in poultry. In: COLÉGIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 1990, **Campinas. Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1990. p. 99-108.

JÚNIOR, J.P.F. **Níveis de metionina+cistina digestíveis para aves de reposição leves nas fases inicial e cria.** Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, PDIZ, CCA, UFPB, Areia, PB. 2013.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 10. ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2004. 427p.

KALINOWSKI, A.; MORAN JÚNIOR; E. T.; WYATT, C. Methionine and cystine requirements of slow- and fast-feathering male broilers from zero to three weeks of age. **Poultry Science**, v. 82, p. 1423-1427, 2003.

KIM, H.J., LEE, G.S., JI, Y.K., CHOI, K.C., JEUNG, E.B. 2006. Differential expression of uterine calcium transporter 1 and plasma membrane Ca²⁺ ATPase 1b during rat estrous cycle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 291, E234–241.

LAMBERS, T. T.; BINDELS, R. J. M.; HOENDEROP, J. G. J. Coordinated control of renal Ca²⁺ handling. **Kidney international**, v. 69, n. 4, p. 650-654, 2006.

LEE, G.S., JEUNG, E.B., 2007. Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 293, E132–138.

LOPES, G.M. **Biodisponibilidade relativa e níveis de metionina para frangos de corte.** Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, PDIZ, CCA, UFPB, Areia, PB. 2014.

MACK, L.A., FELVER-GANT, J.N., DENNIS, R.L. Genetic variations alter production and behavioral responses following heat stress in two strains of laying hens. **Poultry Science**. 92, 285- 294. 2013.

MAROUFYAN E., KASIM A., HASHEMI S.R., LOH T.C., BEJO M.H. Responses of performance and differential leukocyte count to methionine and threonine supplementations on broiler chickens challenged with infectious bursal disease in tropical condition. **Asian Journal of Biological Sciences** 3 (2): 68-76, 2010.

MCCORMICK, Charles C. Passive diffusion does not play a major role in the absorption of dietary calcium in normal adults. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 11, p. 3428-3430, 2002.

MCNAUGHTON, J.L., J.D. MAY AND F.N. REECE, 1984. Response of broiler chickens to dietary energy and lysine levels in warm environment. **Poult. Sci.**, 63:1170-1174.

MELLO, J. F. **Influência dos níveis de cálcio e fósforo na dieta de matrizes de codornas japonesas, no desempenho produtivo e no desenvolvimento ósseo embrionário da progênie**. Maringá: UEM, 2015. 82p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, 2015.

MILLER, S.C. 1992. **Calcium homeostasis and mineral turnover in the laying hen**. In: Whiththead, C.C., (Eds.), **Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry**, Chapter 7. Abingdon, Carfax. jenhuis, T., Hoenderop, J.

MORRISSEY, R. L.; WASSERMAN, R. H. Calcium absorption and calcium-binding protein in chicks on differing calcium and phosphorus intakes. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 220, n. 5, p. 1509-1515, 1971.

NIJENHUIS, T., HOENDEROP, J.G., VAN DER KEMP, A.W., BINDELS, R.J. 2003. Localization and regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 in the kidney. **J. Am. Soc. Nephrol.** 14, 2731–2740.

NRC - National Research Council, Nutrient requirements of poultry, Washington: **National Academy Press**, 9th revised ed., 1994.

NUNES, R. V.; POZZA, P. C.; SCHERER, C.; et al. Efeito dos teores de cálcio para poedeiras semipesadas durante a fase de pré-postura e no início da postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 2007-2012, 2006.

PARMENTIER M, 1990. Calbindin D28k is essentially located in the colonic part of the toad intestine. **Bit/Cell** 68, 43-49

PASTORE, S.M.; OLIVEIRA, W.P. DE; MUNIZ, J.C.L. **Panorama da coturnicultura no Brasil**. Revista eletrônica nutritime. vol.9, n.6, p.2041–2049, Nov./Dez.2012. http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/180%20Panorama%20da%20coturnicultura_.pdf

PAVAN, Ana Cláudia et al. Levels of protein and sulfur amino acids on performance, egg quality and nitrogen excretion of brown egg laying hens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 568-574, 2005.

PEGURI, A.; COON, C. 1991. Effect of temperature and dietary anergy on layer performance. **Poult. Sci.**, 70:126-138.

PENG, J.B., CHEN, X.Z., BERGER, U.V., WEREMOWICZ, S., MORTON, C.C., VASSILEV, P.M., BROWN, E.M., HEDIGER, M.A., 2000. Human calcium transport protein CaT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 326–332.

PINHEIRO, S.G. **Relação energia metabolizável: aminoácidos sulfurosos para aves leves.** Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, PDIZ, CCA, UFPB, Areia, PB. 2014.

PINTO, S.; BARROS, C. S.; SLOMP, M. N.; et al. Cálcio e fósforo na dieta de galinhas de postura: uma revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. 1, p 5-18, 2012.

PIZZOLANTE, CC et al. Calcário e casca de ostra para camadas marrons em seu segundo ciclo de produção de ovos. **Revista Brasileira de Avicultura** , v. 13, n. 2, p. 103-111, 2011.

PLAVNIK, I. Nutrição de aves em climas quentes. In: **Conferência Apinco**. 2003. p. 235-245.

QIN, X.; KLANDORF, H. Effect of estrogen in relation to dietary vitamin D3 and calcium on activity of intestinal alkaline phosphatase and Ca-ATPase in immature chicks. **General and comparative endocrinology**, v. 90, n. 3, p. 318-327, 1993.

QIN, X., KLANDORF, H., PORTER, D.W., HOLT, S.B., MARTIN, W.G. 1993b. Estrogen enhancement of calcium, magnesium, and calcium-magnesium stimulated adenosine triphosphatase activity in the chick shell gland. **Gen. Comp. Endocrinol.** 89, 4–10.

SAKI, A.A.; TIVEY, D.R. Immunohistochemical detection of calbindin D28k and oestrogen receptor in the small intestine of pre – and post – lay hens. **Proc. Aust. Poult. Sci.** 9, 1997.

SANTANA, M.H.M. **Níveis de metionina+cistina para galinhas poedeiras leves nas fases de recria e postura.** Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, PDIZ, CCA, UFPB, Areia, PB. 2014.

SANTOS, T. A. **Métodos de debicagem em poedeiras comerciais**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

SCHERER, C. et al. Avaliação dos teores de cálcio para poedeiras semi pesadas durante a fase de pré-postura, In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2004, Santos. **Anais...** Santos, 2004. p. 98.

SCOTTÁ, B. A.; VIEIRA, R. A.; GOMIDE, A. P. C.; et al. Influência dos minerais quelatados e inorgânicos no metabolismo, desempenho, qualidade da carcaça e da carne de frangos de corte. **PUBVET**, v. 8, n. 9, ed. 258, art. 1710, p. 1-20, 2014.

SEIBEL, N. F.; SCHOFFEN, D. B.; QUEIROZ, M. I.; SOUZA-SOARES, L. A. DE. Caracterização sensorial de ovos de codornas alimentadas com dietas modificadas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.884-889, 2010.

SIEGEL, H.S., 1995. Stress, strains and resistance. **Br. Poult. Sci.** 36: 3-22.

SILVA, E. A. **Níveis de cálcio e relações cálcio: fósforo em rações para galinhas poedeiras**. Viçosa: UFV, 2014. 130p. Tese (Doutorado em Zootecnia), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2014.

SILVA, J. H. V.; JORDÃO FILHO, J.; COSTA, F. G. P.; et al. Exigências nutricionais de codornas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 775-790, 2012.

SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P. **Tabelas para codornas japonesas e europeias**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2009. 107p.

SMITH PR, BRADFORD AL, DANTZER V, BENOS DJ, SKADHAUGE E. Immunocytochemical localization of amiloride-sensitive sodium channels in the lower intestine of the hen. **Cell Tissue Res.** 272(1):129-36, 1993.

STRIEM, S.; BAR, A. Modulation of quail intestinal and egg shell gland calbindin (Mr 28,000) gene expression by vitamin D3, 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and egg laying. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 75, n. 2, p. 169-177, 1991.

SUGIYAMA T, KIKUCHI H, HIYAMA S, NISHIZAWA K, KUSUHARA S. Expression and localisation of calbindin D28k in all intestinal segments of the laying hen. **Br Poult Sci.** 48(2):233-8, 2007.

- SUGIYAMA, T., KUSUHARA, S., 2001. Avian calcium metabolism and bone function. **Asial-Austral. J. Anim. Sci.** 14, 82–90.
- SUMMERS, J.D., J.L ATKINSON, D. SPRATT, 1991. Supplementation of a low protein diet in an attempt to optimize egg mass output. **Can. J. Anim. Sci.**, 71: 211-220.
- SUZUKI, Y., KOVACS, C.S., TAKANAGA, H., PENG, J.B., LANDOWSKI, C.P., HEDIGER, M.A., 2008. Calcium channel TRPV6 is involved in murine maternal-fetal calcium transport. **Bone. Miner. Res.** 23, 1249–1256.
- TANOR, M.A., S. LESSON, J.D SUMMERS, 1984. Effect of heat stress and diet composition on performance of white leghorn hens. **Poult. Sci.**, 63: 304-310.
- VAN ABEL, M., HOENDEROP, J.G., BINDELS, R.J., 2005. The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 371, 295–306.
- VAN DER EERDEN, B.C., HOENDEROP, J.G., DE VRIES, T.J., SCHOENMAKER, T., BURMAN, C.J., UITTERLINDEN, A.G., POLS, H.A., BINDELS, R.J., VAN LEEUWEN, J.P., 2005. The epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 17507–17512.
- VERCESE, F.; GARCIA, E. A.; SARTORI, J. R. et al. Performance and egg quality of Japanese quails submitted to cyclic heat stress. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.14, p.37-41, 2012.
- VIRDEN, WS; KIDD, MT Estresse fisiológico em frangos de corte: Ramificações na digestibilidade e respostas de nutrientes. **Journal of Applied Poultry Research** , v. 18, n. 2, p. 338-347, 2009.
- WASSERMAN, R.H., TAYLOR, A.N., 1966. Vitamin D-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. **Science** 152, 791–793.
- WILKENS, M.R., KUNERT-KEIL, C., BRINKMEIER, H., SCHRÖDER, B., 2009. Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue. **Vet. J.** 182, 294–300.
- WU JC, SMITH MW, MITCHELL MA, PEACOCK MA, TURVEY A, KEABLE SJ. Enterocyte expression of calbindin, calbindin mRNA and calcium transport increases in

jejunal tissue during onset of egg production in the fowl (*Gallus domesticus*). **Comp Biochem Physiol Comp Physiol**. 106(2):263-9, 1993.

YAMAMOTO, KEITH R. Transcrição regulada por receptores esteroides de genes específicos e redes gênicas. **Revisão anual de genética** , v. 19, n. 1, p. 209-252, 1985.

YANG, JH, HOU, JF, FARQUHARSON, C, ZHOU, ZL, DENG, YF, WANG, L, YU, Y 2011. Localisation and expression of TRPV6 in all intestinal segments and kidney of laying hens. **British Poultry Science**, 52:4, 507-516, 2011.

CAPÍTULO 2

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM METIONINA NA MORFOLOGIA DO
INTESTINO, FÍGADO E ÚTERO, E NA POSITIVIDADE E EXPRESSÃO DOS
TRANSPORTADORES DE CÁLCIO CALBINDIN-D28K E TRPV6 DE CODORNAS
POEDEIRAS TERMONEUTRAS E SOB ESTRESSE TÉRMICO**

EFFECT OF SUPPLEMENTATION WITH METHIONINE IN THE MORPHOLOGY OF
THE INTESTINE, LIVER AND UTERUS, AND THE POSITIVITY AND EXPRESSION
OF CALCIUM CONVEYORS CALBINDIN-D28K AND TRPV6 OF QUERIES
THERMOMETERS AND UNDER THERMAL STRESS

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM METIONINA NA MORFOLOGIA DO INTESTINO, FÍGADO E ÚTERO, E NA POSITIVIDADE E EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES DE CÁLCIO CALBINDIN-D28K E TRPV6 DE CODORNAS POEDEIRAS TERMONEUTRAS E SOB ESTRESSE TÉRMICO

RESUMO - O presente estudo teve como objetivo trazer subsídios para a elucidação da atuação, localização e expressão dos canais transportadores de cálcio epiteliais, calbindin-D28k (Calb) e TRPV6 e da morfologia do sistema digestório e reprodutor de codornas de postura termoneutras e sob estresse térmico, com dietas suplementadas ou não por metionina, gerando subsídios para futuros estudos fisiológicos, nutricionais e de produção. Para tanto, o presente estudo caracterizou através de imuno-histoquímica e PCR-real time a positividade (proteína) e expressão (RNAm) dos canais de cálcio, Calb e TRPV6 nos rins, intestino e útero de 504 codornas de postura que foram submetidas a suplementação de metionina em 3 níveis (100, 110 e 120%) e 4 níveis de temperatura (20, 24, 28 e 32°C), assim como, realizou estudos morfofisiológicos nos sistemas digestório e reprodutor sob tais condições. Os animais em estresse térmico apresentaram menores altura de vilosidades, relação vilo:cripta, e índice de células caliciformes no duodeno e jejuno, menos dobras uterínicas secundárias e terciárias, menor esteatose hepática e aumento no número de túbulos contorcidos (TC) distais renais positivos ao Calb (proteína), e aumento da positividade de TC proximais. Os efeitos deletérios do estresse térmico foram minimizados com a suplementação de metionina (120%) para as seguintes variáveis: criptas duodenais, número de células caliciformes do jejuno, número de dobras uterínicas, diminuição da positividade de Calb em intestino e rim, aumento da positividade de Calb no útero e aumento da expressão gênica do TRPV6 no rim. Os transportadores de cálcio foram alterados devido a menor necessidade de absorção e reabsorção de cálcio por ter mais cálcio disponível com a suplementação, aumentando a produção e qualidade dos ovos. A suplementação com metionina ainda promoveu aumento da área de absorção e altura de vilosidade intestinal, aumentou esteatose, diminuiu a positividade de Calb no intestino e rim, aumentou positividade e expressão de Calb no útero e aumentou a expressão gênica de TRPV6 no útero em termoneutralidade. Esse é o primeiro estudo que descreve a expressão gênica e proteica de transportadores de cálcio no intestino, rim e útero de codornas de postura, além de concluir que é justificável o uso da suplementação com metionina, com o objetivo de reverter parcialmente os efeitos deletérios do estresse térmico sobre a produção de codornas de postura.

Palavras-chave: calbindin, TRPV6, nutrição de aves, saúde intestinal.

EFFECTS OF METHIONINE SUPPLEMENTATION ON INTESTINAL, LIVER AND UTERINE MORPHOLOGY, AND IN THE POSITIVITY AND EXPRESSION OF CALBINDIN-D28K AND TRPV6 CALCIUM THERMAL STRUCTURAL CARBON LAYING QUAILS.

ABSTRACT - The present study aimed to provide support for the elucidation of performance, localization and expression of epithelial calcium transport of laying quails, calbindin-D28k (Calb) and TRPV6 and the morphology of the digestive and reproductive system of thermoneutral laying quails and under heat stress, with supplemented diets or not with methionine, generating subsidies for future physiological, nutritional and production studies. Therefore, the present study characterized by immunohistochemistry and real-time PCR positivity (protein) and expression (mRNA) of calcium, Calb and TRPV6 channels in kidneys, intestine and uterus of 504 laying quails that were submitted to methionine supplementation at 3 levels (100, 110 and 120%) and 4 temperature levels (20, 24, 28 and 32°C), as well as conducted morphophysiological studies on the digestive and reproductive systems under such conditions. Animals under thermal stress had lower villus height, villus: crypt ratio, and goblet cell index in the duodenum and jejunum, fewer secondary and tertiary uterine folds, lower hepatic steatosis, and increased number of distal renal twisted tubules (CT). Calb (protein), and increased positivity of proximal CT. Deleterious effects of heat stress were minimized with methionine supplementation (120%) for the following variables: duodenal crypts, number of goblet cells of the jejunum, number of uterine folds, decreased calcium positivity in intestine and kidney, increased calcium positivity in the womb and increased TRPV6 gene expression on kidney. Calcium transporters were altered due to less need for calcium absorption and resorption due to more calcium available with supplementation, increasing egg production and quality. Methionine supplementation further increased the area of absorption and height of intestinal villus, increased steatosis, decreased calcium positivity in the intestine and kidney, increased positivity and calcium expression in the womb, and increased TRPV6 gene expression in the thermoneutrality. This is the first study that describes the gene and protein expression of calcium transporters in the intestine, kidney and uterus of laying quails, and concludes that the use of methionine supplementation is justifiable in order to partially reverse the deleterious effects of thermal stress in the laying quails production.

Keywords: calbindin, TRPV6, bird nutrition, intestinal health.

INTRODUÇÃO

A coturnicultura de postura vem crescendo no Brasil, principalmente na região nordeste [1]. A produção se apresenta com uma atividade bastante rentável e com amplas perspectivas, o que induz o desenvolvimento de pesquisas visando melhor produção, aperfeiçoando técnicas e alternativas para alcançar padrão de qualidade e expansão desta por todo território.

Em climas tropicais, como nas encontradas na maior parte do Brasil, as aves em consequência do estresse térmico, sofrem redução dos seus índices zootécnicos como também um aumento na mortalidade, levando à perdas produtivas e econômicas na produção [2]. Tal fato é principalmente observado na coturnicultura de postura, onde o primeiro fator restritivo para a formação a casca do ovo é o cálcio, e o mesmo é influenciado negativamente pela elevação da temperatura [3].

O cálcio é proveniente principalmente da absorção intestinal e reabsorção óssea, o qual é mobilizado do sangue para o útero de forma muito rápida [4,5]. Nascimento et al. [6] afirmaram que 70% do custo de produção estão baseados na alimentação, e por este motivo há a necessidade do desenvolvimento de dietas balanceadas de acordo com as necessidades das aves, lhes proporcionando a utilização da dieta com máxima eficiência.

Para aves submetidas ao estresse térmico, se torna necessário a suplementação das rações com aminoácidos glicogênicos, como metionina, cistina e outros [7]. Em tais condições de estresse térmico ocorre mudanças fisiológicas e comportamentais nas codornas, as quais afetam severamente o consumo de ração e provocam mudanças estruturais no epitélio intestinal, diminuindo a digestibilidade e absorção dos nutrientes [8].

A metionina classificada como aminoácido essencial [9], é também o primeiro limitante na alimentação de aves, sendo primordial para manutenção, crescimento, produção e para o desenvolvimento das penas [10]. Além das respostas produtivas com a suplementação por metionina em poedeiras, estudos indicam através de análises morfológicas do sistema digestório e reprodutor de poedeiras, em frangos de corte e em aves leves, alterações favoráveis quantitativa e qualitativas, como aumento da massa do ovo em 10% [11,12], diminuição da gordura de poedeiras [13], aumento da espessura da casca do ovo [14], e aumento das vilosidades intestinais [15], que proporcionam e justificam tecnicamente a melhoria nos índices zootécnicos desses animais [15-18].

Avaliando a literatura existente [15-18], admite-se que dietas suplementadas com metionina em níveis acima da recomendação do NRC (National Research Council) pode ser

uma estratégia nutricional para minimizar danos provocados pelo estresse térmico melhorando a performance de aves de postura nas regiões mais quentes. Tais estudos são escassos em poedeiras e mais ainda em codornas de postura.

Sendo assim, mediante a lacuna nas pesquisas relacionadas ao assunto descrito, objetivou avaliar o efeito da suplementação com metionina na morfologia intestinal; na relação vilo:cripta; na quantidade de células caliciformes; no estoque de glicogênio hepático e de esteatose; na morfologia uterina em codornas de postura termoneutras e sob estresse térmico por alta temperatura. Assim como, a positividade e a expressão gênica dos canais de cálcio calbindin-D28k e TRPV6 nas aves sob as mesmas condições, a fim de se avaliar a alteração de tais canais diante da suplementação com metionina em aves termoneutras e sob estresse térmico, uma vez que os mesmos são descritos como principais transportadores de cálcio, atuando em intestino, rins e útero de aves [19,20].

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas um total de 504 codornas japonesas em fase de produção (segundo ciclo), distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4, sendo três níveis de metionina (100%, 110% e 120%) e quatro faixas de temperatura (20, 24, 28 e 32 °C), representando faixas de termoneutralidade e de estresse térmico, totalizando doze tratamentos. As dietas foram formuladas segundo recomendação do NRC (National Research Council).

Tabela 01 - Dietas experimentais contendo três níveis de suplementação de Metionina para codornas de postura.

Ingredientes	T1	T2	T3
	100% Met+Cys (0.888%)	100+10% Met+Cys (0.977%)	100+20% Met+Cys (1.066%)
Milho, 788%	58,466	58,466	58,466
F. de soja, 45%	30,071	30,071	30,071
Óleo de soja	0,906	0,906	0,906
Calcário calcítico	7,041	7,041	7,041
Fosfato bicalcico, 18,5%	1,142	1,142	1,142
Sal comum	0,326	0,326	0,326
L-Lisina HCl	0,342	0,342	0,342
L-Treonina	0,078	0,078	0,078
L-Triptofano	0,040	0,040	0,040
Cloreto de colina, 60%	0,070	0,070	0,070
Premix mineral	0,050	0,050	0,050
Premix vitamínico	0,025	0,025	0,025
Antioxidante	0,010	0,010	0,010
DL-Metionina	0,441	0,537	0,633
Amido	0,673	0,536	0,400
Inerte	0,319	0,360	0,400
TOTAL, kg	100,00	100,00	100,00
Composição química			
PB, %	18,80	18,80	19,00
EM, kcal/kg	2800	2800	2800
Met dig, %	0,685	0,779	0,870
Met + Cis dig, %	0,942	1,036	1,130
Lis dig, %	1,148	1,148	1,148
Treo dig, %	0,701	0,701	0,701
Val dig, %	0,785	0,785	0,785
Trp dig, %	0,241	0,241	0,241
Arg dig, %	1,152	1,152	1,152
Ile dig, %	0,717	0,717	0,717
Leu dig, %	1,485	1,485	1,485
Cálcio, %	2,99	2,99	2,99
Fósforo disponível, %	0,31	0,31	0,31
Sódio, %	0,15	0,15	0,15
Cloro, %	0,24	0,24	0,24
Potássio, %	0,72	0,72	0,72
BE, mEq/kg	179,00	179,00	179,00

Processamento Histológico

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Histologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. As amostras biológicas de intestino (duodeno e jejuno), fígado, útero e rim de 8 animais escolhidos aleatoriamente de cada tratamento foram coletadas e fixadas em Metacarn [21] por 12h e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados com 5 µm de espessura. Utilizou-se coloração de hematoxilina-eosina e Periodic Acid Schiff (PAS), dependendo da análise, e a captura de imagens digitalizadas foi realizada em microscópio Olympus BX-60 e câmera Zeiss AxioCam acoplada com programa de captura de imagens digitais Motic Image Plus 2.0. As amostras de duodeno foram coletadas 4 cm depois do ventrículo e as de jejuno na região média desse segmento. Ambas

foram incluídas em sentido transversal, de modo que fosse possível a visualização das vilosidades intestinais, assim como o lúmen do órgão. As amostras de rim e fígado foram coletadas de forma a nunca ultrapassar 0,5 cm³ para a adequada fixação do tecido. As amostras do útero foram coletadas na região lateral média com dimensão de 1 cm².

As análises de histomorfometria foram realizadas por um único histologista para evitar erros de interpretação. Foi utilizado ANOVA e post test de Tukey à nível de 5% de significância para avaliar qual a influencia da suplementação de metionina nos diferentes tipos de temperatura.

Morfologia Duodenal e Jejunal

Em oito animais de cada tratamento foram digitalizadas cinco fotomicrografias, e duas mensurações em cada imagem, totalizando 80 mensurações (8 animais x 5 fotomicrografias x 2 mensurações) de altura de vilosidades intestinais e de suas respectivas criptas de cada tratamento, por meio de analisador de imagens Motic Image Plus 2.0 e câmera digital Motic acoplada em microscópio Olympus BX-40. As medidas de altura de vilo foram mensuradas da sua base até seu ápice, a largura foi mensurada na porção média de cada vilosidade e a cripta foi mensurada a partir da base de sua respectiva vilosidade. A Relação Vilo:Cripta foi dada pela divisão da Altura de Vilosidade pela sua respectiva Cripta.

Para a quantificação do índice de células caliciformes no epitélio de duodeno e jejuno foram utilizadas lâminas histológicas de oito animais por tratamento coradas com a coloração de PAS que cora de magenta as células caliciformes. Foram captadas e digitalizadas imagens com a objetiva de 20x das vilosidades intestinais. Aleatoriamente foram escolhidas pelo menos 2 imagens de cada animal e mensurado o epitélio intestinal linearmente até perfazer 2.000 µm, sendo contabilizado o número de células caliciformes a cada 500 µm, perfazendo um número amostral de 32 por tratamento (8 animais x 4 áreas de 500 µm). A partir dos resultados foi definida, a partir de regra de três, a quantidade de células caliciformes em 1.000 micrômetros para cada tratamento.

Mensuração de estoque de glicogênio hepático e de esteatose hepática

Para a mensuração de estoque de glicogênio hepático, após o processamento histológico já mencionado e coloração de PAS, 5 fotomicrografias de 8 animais de cada tratamento, escolhidos aleatoriamente foram analisadas à microscopia óptica pelo mesmo histologista, sem o prévio conhecimento deste sobre o grupo pertencente de cada ave,

totalizando um número amostral de 40 por tratamento (8 animais x 5 fotomicrografias). As mesmas foram classificadas de acordo com o grau de depósito de glicogênio em virtude da positividade à histoquímica de PAS: Grau +: pouco depósito de glicogênio hepático; Grau ++: moderado depósito de glicogênio hepático; e Grau +++: acentuado depósito de glicogênio hepático. Para análise do índice de depósito de glicogênio hepático, as cruzes foram transformadas em números correspondentes (+ = 1, ++ = 2, +++ = 3) para a realização da estatística conforme Escore Semi quantitativo de Ishak [22] modificado.

Para avaliação da esteatose hepática, foi atribuído um escore de avaliação para cada fígado analisado através de fotomicrografias hepáticas de cada animal (8 animais por tratamento), totalizando um número amostral de 40 por tratamento (8 animais x 5 fotomicrografias), considerando a quantidade e o tamanho dos vacúolos citoplasmáticos lipídicos dos hepatócitos, sendo: 0 (ausência de esteatose), 1 (pouca esteatose), 2 (esteatose moderada) e 3 (esteatose avançada), seguindo de forma modificada o Escore Semi Quantitativo de Ishak [22]. Para cada tratamento foi obtido uma média, a qual foi submetida a estatística.

Morfologia do Útero

Após o processamento histológico e a coloração histoquímica de PAS foi realizada a captura de imagens digitalizadas. As fotomicrografias, 5 de cada um dos 8 animais por tratamento, perfazendo um número amostral de 40, foram avaliadas conforme a presença e quantidade de dobras uterínicas, sendo avaliadas conforme Escore Semi quantitativo de Ishak [22] modificado. O score 1 era dado para presença apenas de dobras primárias, score 2 para dobras primárias e algumas secundárias, score 3 para presença de dobras primárias, secundárias e algumas terciárias, e o score 4 para úteros com inúmeras dobras terciárias. As fotomicrografias foram analisadas à microscopia óptica pelo mesmo histologista, sem o prévio conhecimento deste sobre o grupo pertencente de cada ave.

Imunohistoquímica para anti-Calbindin-D28k

Foram utilizadas lâminas histológicas contendo duodeno, jejuno, útero e rim de 6 animais por tratamento escolhidos aleatoriamente. O anticorpo foi o calbindin-D28K (Sigma, Clone Cl3000). As lâminas foram desidratadas, submetidas ao bloqueio com 3 banhos de peróxido de hidrogênio por 10 minutos cada e lavadas com tampão fosfato (PBS) por 3 vezes de 3 minutos. O desmascaramento foi realizado com tampão citrato (pH 6,0) por 10 minutos

em microondas, esperando a temperatura baixar por mais 20 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em PBS e incubadas a 4°C overnight com o anticorpo diluído em PBS (1:200). No dia seguinte foram colocadas nas lâminas anticorpo secundário biotilado por 15 minutos, seguido da incubação em complexo streptavidina-peroxidase (DAKO-LSAB) por 30 minutos. As células positivas foram marcadas pelo cromógeno DAB (DAKO) por 5 minutos. As fotomicrografias foram realizadas pelo programas KS-400 Zeiss em microscópio Olympus BX60 e câmera AxioCam. Quanto mais positivo ao anticorpo, maior era a produção proteica do calbindi-D28k.

PCR em Tempo Real (qPCR) para TRPV 6 e Calbindin-D28k

Foram utilizadas amostras de duodeno e jejuno, rim e útero de 6 animais escolhidos aleatoriamente por tratamento. Para a realização da extração de RNA foram utilizados dois protocolos, PureLink™ RNA Mini Kit – Thermo Fisher Scientific e ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System. As amostras de RNA foram mantidas no Ultra Freezer a -80°C até a realização da Síntese de cDNA, através do Kit Invitrogen™ SuperScript™ IV Master Mix VILO™ com Enzima ezDNase™.

A qPCR foi realizada utilizando MxPro - Mx3005P v4.10 Build 389, Schema 85 (Stratagene®, Estados Unidos). Todas as reações de qPCR usaram a Mistura Principal QBRR Verde Ultra-Rápida de Brilliant III da SYBR® com Baixo ROX (Agilent Technologies). A Beta Actina foi usada como controle endógeno, e todos os oligonucleotídeos foram obtidos a partir de sequências de DNA de codornas japonesas previamente publicadas no banco de genes PubMed, e obtidas a sequência dos primers a partir do Primer3Plus – Bioinformatics (Tabela 2). As condições de amplificação foram 3 minutos a 95 ° C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 20 segundos a 60 °C; 1 minuto a 95°; 30 segundos a 55° e, finalmente, 30 segundos a 95°.

A análise da curva de fusão permitiu a avaliação da especificidade dos produtos qPCR. As amostras foram corridas em triplicado para cada amostra e a quantificação relativa (gene alvo / controle endógeno) determinou a sua expressão. Os dados foram normalizados para uma amostra de calibrador usando o método $\Delta\Delta C_t$ com correção para eficiência de amplificação [23].

Tabela 02. Sequência de primers utilizados para PCR quantitativa – real time para codornas.

Genes	qPCR Primers (5'-3')	Número do GenBank
<i>Calbindin28</i>	>GACGGCAATGGGTACATGGA <TCGGGTGTTAAGTCCAAGCC	XM_015855985.1
<i>TRPV6</i>	>CCATCATTGCCACCCTCCTT <AGCAACAATCTGGGCTCTCC	XM_015873874.1
<i>Beta Actina</i>	>CCACTGGCATTGTCATGGACTCT <TCCTTGATGTCACGGACGATTTC	X00182.1

> = forward, < = reverse

Análise estatística

Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e, de acordo com a significância do teste F ($P \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo Teste SNK (Student-Newman-Keuls) em até 5% de probabilidade de erro. Estas análises foram realizadas utilizando-se o SAS[®] University Edition [24]. Realizou-se ainda análise de correlação de Pearson utilizando-se o JMP[®] Pro 13. Os dados foram representados por médias \pm desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Histologia

Morfologia Duodenal e Jejunal

A partir das análises histomorfométricas do intestino, verificou-se que a variável altura de vilosidade (AV) em codornas de postura, é reduzida durante o estresse térmico no duodeno e jejuno (Tabela 3), corroborando Mitchell e Carlisle [25], que observaram diminuição na altura das vilosidades jejunais de frangos de corte mantidos em estresse térmico constante comparado com aves em termoneutralidade.

A suplementação com 120% de metionina proporcionou maiores AVs nas temperaturas termoneutras de 20 e 24°C, mas não nas temperaturas maiores, incluindo a temperatura de estresse térmico (32°C). Sendo assim, a suplementação com metionina é ineficiente na reversão dos efeitos maléficos do estresse térmico por calor para AV. A suplementação com 120% de metionina levou inclusive à diminuição das AVs, na temperatura de 32°C. Tal evento, sem constestualizar a profundidade de cripta, leva a crer na

diminuição da área intestinal e consequente menor contato com o alimento, diminuição da absorção de nutrientes e da produção.

No jejuno, os efeitos foram semelhantes, a suplementação com 120% de metionina promoveu o aumento da AV na temperatura de 20°C, manteve a AV em 24°C, e também reduziu a AV em 28 e 32°C. Dessa forma, a suplementação por metionina também não foi eficaz em minimizar os efeitos deletérios do estresse por calor nesse segmento do intestino delgado.

Os efeitos negativos da alta temperatura ambiente são conhecidos e foram relatados por Marchini et al. [27], onde a alta temperatura ambiente até a quarta semana de idade promoveu redução na secreção de enzimas digestivas e na AV de frangos de corte.

De acordo com alguns autores, a digestibilidade dos alimentos e a integridade da mucosa intestinal estão fortemente relacionadas às variações da temperatura ambiente. Assim, a baixa quantidade de alimento presente no trato gastrointestinal durante o estresse térmico também prejudica o estímulo trófico da mucosa intestinal, além de diminuir a secreção das enzimas digestivas [27].

Em altas temperaturas o consumo de ração é diminuído, na tentativa de diminuir a produção do calor endógeno que poderia causar danos na morfologia e integridade intestinal, comprometendo os mecanismos de digestão e absorção e, consequentemente, reduzindo o desempenho das aves [26]. Sendo assim, tal redução pode ter levado a um menor consumo de metionina em 32°C, e comprometendo o efeito esperado da metionina em reverter, pelo menos em parte, os efeitos deletérios do estresse térmico na AV tanto em duodeno como no jejuno. Animais mantidos nas menores temperaturas desse estudo mantiveram seu consumo de ração, podendo explicar assim o aumento das médias das vilosidades duodenais. De toda forma, o uso da suplementação de metionina para essa variável não seria justificado, não sendo dessa forma recomendado.

Tabela 3. Morfometria do sistema digestório e reprodutor de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) de postura suplementadas (S) com metionina em níveis de 100%, 110% e 120% submetidas a diferentes temperaturas (20°, 24°, 28° e 32°C).

Variável	S %	Temperatura (°C)			
		20	24	28	32
Duodeno AV	100	860,85±140,49aB	808,93±73,59bB	811,22±97,36bA	822,56±107,17abA
	110	673,9±106,13cC	856,47±90,46aA	829,90±127,27aA	757,96±73,81bB
	120	937,65±113,96aA	886,30±90,76bA	760,13±67,55cB	729,15±68,09dC
Jejuno AV	100	631,19±95,47bB	678,79±60,45aA	653,87±83,03abA	676,65±77,91aA

	110	628,78±98,38aB	564,32±51,51bB	578,69±129,69bB	575,78±85,11bB
	120	691,92±66,93aA	656,45±69,34bA	547,94±113,41cB	557,35±77,37cB
Duodeno PC	100	46,37±9,69bB	54,43±11,33aA	49,97±9,60abA	45,25±7,04bcAB
	110	49,97±9,94aB	48,92±8,21aB	47,77±8,67aAB	44,17±6,88bB
	120	57,40±13,31aA	48,93±8,91bB	44,84±7,73cB	47,57±7,85bcA
Jejuno PC	100	37,27±5,89cB	40,60±7,68bB	45,79±7,53aA	44,59±6,70aA
	110	39,72±6,91bAB	39,83±6,47bB	40,83±5,90abB	42,36±4,78aA
	120	41,12±7,64bA	44,84±7,33aA	41,11±8,03bB	44,13±6,02aA
Vilosidade: CRIPTA Duodeno	100	19,38±5,20aA	15,49±3,38bB	16,66±3,08bA	18,45±2,91abA
	110	14,05±3,69bC	17,93±3,20aA	17,89±4,01aA	17,58±3,28aA
	120	16,88±2,92bcB	18,84±3,57aA	17,41±3,16bA	15,71±2,85cB
Vilosidade: CRIPTA Jejuno	100	17,16±2,79aA	17,18±2,93aA	14,61±2,74bA	15,52±2,94bA
	110	15,99±2,13aB	14,55±2,83abB	14,40±3,55abA	13,78±2,67bB
	120	17,35±3,41aA	14,98±2,68bB	13,46±2,24bcA	12,80±2,17cB
CC Duodeno	100	27,71±8,56abB	31,38±7,65aA	30,50±9,93aA	23,33±7,61bB
	110	42,79±15,33aA	31,08±6,66bcA	36,00±6,78bA	27,21±4,23cAB
	120	33,08±9,05aB	25,13±8,36bB	35,58±7,92aA	30,46±6,09abA
CC Jejuno	100	36,25±6,53abA	32,67±7,88bB	40,13±11,16aA	43,42±11,99aA
	110	39,17±10,56bA	49,04±12,16aA	38,42±8,80bA	39,75±7,89bA
	120	39,38±10,73aA	42,88±11,22aA	40,21±8,06aA	44,67±8,84aA
Dobras Uterinas	100	3,11±0,68aA	3,12±0,99abA	2,87±0,64bcB	2,28±0,83cA
	110	3,06±0,73aA	3,22±0,73aA	3,06±1,06aA	2,39±0,61bA
	120	3,43±0,51bA	3,50±0,71aA	2,28±0,75bB	2,83±0,71bA
Esteatose Hepática	100	1,17±0,59abA	1,43±0,97aA	0,70±0,75bB	0,87±0,78abA
	110	1,07±0,64aA	0,87±1,07aB	0,60±0,67aB	0,90±0,80aA
	120	1,10±0,84abA	1,57±1,19aA	1,43±1,04abA	0,87±1,01bA
Glicogênio Hepático	100	1,17±0,38aA	1,30±0,53aB	1,43±0,63aA	1,43±0,63aA
	110	1,17±0,38bA	2,53±0,63aA	1,03±0,18bB	1,27±0,45bA
	120	1,43±0,50aA	1,00±0,00bB	1,50±0,51aA	1,43±0,68aA

Médias seguidas de mesma letra minúsculas na linha e maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey em até 5% de probabilidade; AV: altura de vilosidades; PC: profundidade de cripta; Vilosidade:Cripta: Relação vilosidade:cripta

Apesar da suplementação com metionina (120%) não ter demonstrado eficácia para aumento das vilosidades duodenais e jejunais sob estresse térmico por calor, e assim reverter os efeitos deletérios na morfologia intestinal, é visto que a mesma pode ser eficiente em aumentar a área de absorção (aumento da AV) em termoneutralidade.

As criptas intestinais estão relacionadas com a saúde intestinal do animal, quanto maior a profundidade de cripta (PC), maior a regeneração de vilosidade devido a possíveis lesões (mecânicas e/ou outros mecanismos patogênicos) ocorridas, ou devido a crescimento de vilosidade relacionado com o crescimento animal [28], tornando-se uma importante variável a ser analisada. Assim, o aumento da PC também pode antever um aumento da AV

quando um agente trófico é apresentado, pois é exatamente nessa região que são produzidas as células que vão migrar para garantir a manutenção e/ou aumento da AV.

As análises histomorfométricas de PC no duodeno demonstraram que nas temperaturas termoneutras para codornas a PC foi menor, ou seja, na temperatura de estresse térmico (32°C) e na mais baixa (20°C), próxima ao estresse térmico por baixa temperatura, há maior necessidade de *turnover celular*. Já a suplementação de 120% de metionina levou a uma diminuição da PC nas temperaturas mais altas (28 e 32°C). Podemos inferir, que em altas temperaturas, a suplementação por metionina reduziu os efeitos deletérios do estresse, reduzindo a necessidade de proliferação celular nessa região. O mesmo resultado encontrado para duodeno, em relação à suplementação por metionina, foi encontrado no jejuno. Já em relação a temperatura, PC foi diferente apenas em 20°C, sendo menor nessa temperatura. Os resultados demonstram que a suplementação de metionina em altas temperaturas leva a diminuição da PC, o que leva a uma maior relação vilosidade: cripta, variável essa utilizada como importante marcador de saúde intestinal, por revelar uma maior área de contato com o alimento, consequentemente maior absorção, sem a necessidade de gastos energéticos demasiados com turnover na cripta.

A hiperplasia do epitélio da cripta encontrado em 32°C deve ter sido induzida para restabelecer a altura da vilosidade, sendo considerado um mecanismo compensatório [29], visto que o estresse térmico por calor em frangos de corte por quatro dias consecutivos provoca alterações negativas nas vilosidades e nas criptas do duodeno e do jejuno, incluindo redução na altura dos vilos e na relação vilo/cripta, na área de absorção e aumento da profundidade da cripta.

A relação vilosidade: cripta (RVC) está relacionada à saúde intestinal do animal, quanto maior a relação, maior a saúde intestinal do animal. Verificou-se com os resultados que, a redução das PC encontradas na suplementação com metionina nas altas temperaturas (28 e 32°C) em duodeno e jejuno, não se traduziu em maiores RVC. Ao contrário, nos dois segmentos intestinais nas temperaturas de 32°C, a RVC foi menor após a suplementação com metionina. A melhora da saúde intestinal observada a partir do aumento da RVC somente foi observada na temperatura de 24°C a nível duodenal. Tais resultados revelam que a suplementação de metionina em estresse térmico em codornas de postura não reverte os efeitos deletérios do calor na RVC. Em relação às diferentes temperaturas, o aumento desta variável também levou a uma diminuição da saúde intestinal, ou seja, menor RVC.

Tais resultados corroboram Wu et al. [30], os quais relatam que o estresse térmico por calor é prejudicial a integridade da mucosa intestinal de frangos de corte, onde os vilos se tornam mais curtos e chatos, e consequentemente a cripta aumenta sua atividade se tornando mais profunda na tentativa de reverter essa situação, com isso a relação vilo/cripta diminui. Segundo os autores alta temperatura ambiental reduz o consumo de ração pelas aves [30], justificando a redução na relação vilosidade/cripta em alta temperatura. Isso leva a uma menor quantidade de energia disponibilizada para manutenção e renovação da mucosa intestinal e consequentemente para a produção.

As células caliciformes (CC) tem importante função no sistema digestório dos animais, sendo inclusive comparado a sua quantidade com o grau de saúde intestinal. As mesmas produzem um muco, a mucina, que protege o epitélio intestinal de agentes infecciosos e agentes mecânicos, além de formar o glicocálix que também tem função importante na digestão intestinal [31]. É de conhecimento, assim como aconteceu no presente estudo a nível duodenal (redução de células caliciformes em 32°C), que altas temperaturas diminuem a quantidade e produção das células caliciformes, diminuindo dessa forma a saúde intestinal. Sandikci et al. [32] relataram significativa redução de células caliciformes nos três segmentos intestinais em codornas japonesas submetidas ao estresse térmico, além da altura das vilosidades. Segundo os autores, pode-se relacionar os danos observados na mucosa intestinal, incluindo diminuição de células caliciformes, principalmente ao baixo consumo de ração, durante o estresse térmico [33]. Diferentemente do encontrado na literatura [32] para galinhas, o aumento da temperatura não diminuiu as CC no jejuno, talvez por codornas serem mais tolerantes ao calor que galinhas poedeiras.

A suplementação com metionina levou a um aumento das CC quando do estresse térmico (32°C) no jejuno. Esses resultados demonstram que a suplementação por metionina em estresse térmico reverte os efeitos deletérios por calor no jejuno, mas não no duodeno. O aumento de CC encontrado no jejuno em condições que mimetizam o estresse térmico por calor, proporciona melhor proteção à mucosa intestinal e melhor digestão, levando a uma melhor saúde intestinal [34], justificando dessa forma a utilização da suplementação da metionina nesse caso.

O aquecimento climático vem causando preocupação para o setor da coturnicultura, uma vez que estresse térmico por calor, como os resultados demonstram, promove várias alterações no comportamento e nos mecanismos fisiológicas das codornas, culminando com

alterações morfológicas maléficas, baixo desempenho das aves e perdas econômicas para o setor [35].

Histomorfometria Uterínica

Os resultados morfométricos demonstraram pela primeira vez em codornas que o aumento da temperatura, ou seja, o estresse térmico (32°C) causa diminuição nas dobras uterínicas, principalmente nas secundárias e terciárias, o que implica em menor área para a produção de carbonato de cálcio, principal composto da casca do ovo [3], influenciando negativamente na produção de ovos pelos animais. A alta temperatura também diminuiu a produção e a espessura da casca do ovo (Tabela 4). Os maiores índices de dobras uterínicas foram encontrados nos tratamentos com 20 e 24°C.

Estes resultados corroboram os resultados de produção de ovos (Tabela 4), onde um maior desempenho produtivo foi encontrado com 24°C, sendo o menor desempenho com 32°C.

Tabela 4. Média do desempenho produtivo e espessura de casca de ovo de codornas em fase de postura submetidas à suplementação com metionina em 3 níveis (100, 110 e 120%) e 4 faixas de temperatura que variam da termoneutralidade ao estresse térmico.

Nível x Temp	Produção % 2º Período			
	20°C	24°C	28°C	32°C
100%	89,55±3,70aA	92,2±4,42aA	85,24±4,41aA	83,81±14,94aA
110%	91,67±3,40aA	91,27±6,02aA	85,32±5,21abA	76,98±11,35bA
120%	93,52±8,54abA	98,23±9,78aA	85,3±6,77bcA	74,78±6,78cA
	Espessura de Casca 2º Período			
	20°C	24°C	28°C	32°C
100%	0,27±0,02aA	0,25±0,01bA	0,26±0,02abA	0,25±0,01bA
110%	0,27±0,01aA	0,25±0,01aA	0,26±0,01aA	0,26±0,02aA
120%	0,27±0,01aA	0,26±0,01aA	0,27±0,01aA	0,26±0,01aA

Médias seguidas da mesma letra minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey em até 5% de probabilidade.

Apesar da literatura citar que a suplementação por metionina aumenta a quantidade de dobras no útero em poedeiras e em aves leves [15-18], tal evento não pode ser observado

quando aplicado o estresse térmico neste estudo com codornas. Apenas houve aumento do índice de dobras uterínicas em 28°C com suplementação de 110% de metionina, entretanto, tais resultados não interferiram na produção de ovos (tabela 4). Podemos inferir que a suplementação por metionina, salvo 110% em 28°C, não minimiza os efeitos deletérios do estresse térmico a nível de dobras uterínicas em codornas.

Mensuração de estoque de Glicogênio hepático e de Esteatose hepática

O aumento da temperatura ambiente diminuiu o índice de esteatose hepática, sendo os índices maiores em 20 e 24°C. A suplementação com metionina (120%) aumentou tal índice apenas na temperatura de 24°C. Tal resultado difere do encontrado por Bunchasak et al. [14], os quais descrevem em galinhas poedeiras, que quanto maior a suplementação de metionina maior será a síntese de ácidos graxos, e assim consequentemente maior taxa de esteatose hepática. Tal variável tem importância uma vez que o aumento da esteatose hepática está relacionada à produção de estrógeno, ou seja, quanto maior a esteatose, maior seria a produção de estrógeno e maior seria consequentemente a produção de ovos [14]. Dessa forma a suplementação de metionina (120%) em 24°C, não apenas aumentaria a esteatose hepática, mas também a produção de ovos por essas codornas, o que ocorreu no presente estudo, uma vez que o aumento da esteatose hepática se refletiu em aumento significativo da produção (Tabela 4). Em contrapartida, as aves submetidas à temperatura de 20°C, mesmo não apresentando aumento de esteatose, tiveram aumento da produção de ovos (Tabela 4).

Os níveis de glicogênio hepático não pareceram ser modificados com a alteração da temperatura ambiental, corroborando estudos com frango de corte realizados por Lana et al. [36]. Entretanto, sendo contrário aos resultados para frangos, que apresentaram diminuição dos estoques de glicogênio hepático, além de diminuição na ingestão de ração e ganho de peso [37] e redução do peso do fígado [38] com consequente redução na atividade metabólica, sob estresse térmico.

Contudo, apenas na temperatura de 24°C, a suplementação com 110% de metionina fez aumentar o estoque de glicogênio hepático. Tais resultados demonstram que em termoneutralidade, a suplementação de 110% maximiza o estoque de energia em forma de glicogênio a nível hepático. Tal excedente pode ser transferido para a produção, nesse caso, na produção de ovos. Sendo assim, no estresse por calor a suplementação por metionina não se fez eficiente.

Imunoistoquímica

Em linhagens modernas de galinhas poedeiras, podendo ser extrapolado para codornas de postura, o equivalente a 10% do total de cálcio corpóreo é transferido diariamente para deposição como casca para ovos [39-41]; sendo as maiores fontes de cálcio, a absorção da dieta a nível intestinal, a reabsorção renal e dos estoques dos ossos. Uma vez que o calbindin-k28D é o transportador responsável pela absorção do cálcio pelo sistema digestório, o mesmo teria a capacidade de modular, além da capacidade absorptiva intestinal [45], a deposição do mesmo no útero [46], influenciando a produção e na qualidade da casca do ovo.

Intestino

Para todos os tratamentos (temperaturas e níveis de metionina), houve positividade ao anti-calbindin-k28D por todo epitélio duodenal; a lâmina própria (camada de tecido conjuntivo abaixo do epitélio) não foi positiva (Figura 1). A positividade foi mais intensa na porção basal e mais apical do epitélio, visto que a porção média era uma área que possuía muitos núcleos de enterócitos e a presente marcação é citoplasmática. A área mais positiva foi a da superfície apical dos enterócitos. Diferentemente, as células caliciformes não foram positivas ao anti-calbindin-k28D. Tais resultados corroboram o estudo realizado em poedeiras, o qual afirma que no intestino de poedeiras, há positividade (proteína) de calbindin-D28k em todos os segmentos, sendo maior no duodeno e jejuno, principalmente nas porções apicais das vilosidades, sendo menor em íleo [41,47].

A positividade ao anti-calbindin-k28D no epitélio do intestino duodenal corrobora a absorção do cálcio nessa região. A maior intensidade de positividade na porção apical dos enterócitos corrobora estudos anteriores [41] que citam o calbindin-k28D como um transportador celular de cálcio. Tal transportador se liga ao cálcio absorvido pela célula e o difunde pelo citoplasma, o qual é finalmente extrusado pelo CA^{2+} -ATPase na membrana basolateral, chegando ao sistema vascular através de vasos da lâmina própria [41]. A forma presente em aves é a com peso molecular de 28kDa, ou calbindin-D28k, presente no rim, cérebro e intestino e úteros de aves [42-44,20].

As células caliciformes não são positivas, uma vez que tais células não tem função de absorção, e sim de produção, sendo as mesmas responsáveis por produzir e liberar mucina na superfície intestinal, assim como, em outros órgãos.

Entre as temperaturas estudadas, houve menor positividade ao transportador de cálcio nas temperaturas de 24 e 28°C (Figura 2), quando comparada a 20°C, e principalmente 32°C. Nas temperaturas na qual houve menor positividade, o aumento do nível de metionina proporcionou ainda menor positividade ao anti-calbindin-k28D. Em 32°C (estresse térmico), a suplementação por metionina (120%), também levou a uma menor positividade ao calbindin-D28k quando comparado ao nível de 100%.

A diminuição da positividade poderia ser explicada pelo aumento da disponibilidade do cálcio e consequentemente menor necessidade de absorção, e aumento da qualidade da casca do ovo, o que realmente ocorreu no presente estudo. Apesar do modelo de atuação da calbindin-D28k já ser descrito em poedeiras, esse é o primeiro estudo em codornas. Em estudo com suplementação de metionina em dietas com menores níveis de proteína na Tailândia, país com semelhanças térmicas às do Nordeste brasileiro, houve aumento nos índices de produção em poedeiras, incluindo aumento de espessura de casca de ovo [14]. No estudo supracitado, o aumento da metionina também deve ter minimizado o efeito deletério do estresse térmico aumento a disponibilidade do cálcio para melhorar os índices de produção, assim como, ocorreu no presente estudo. Há de se imaginar que nesse estudo citado a positividade do calbindin-D28k também deva ter diminuído.

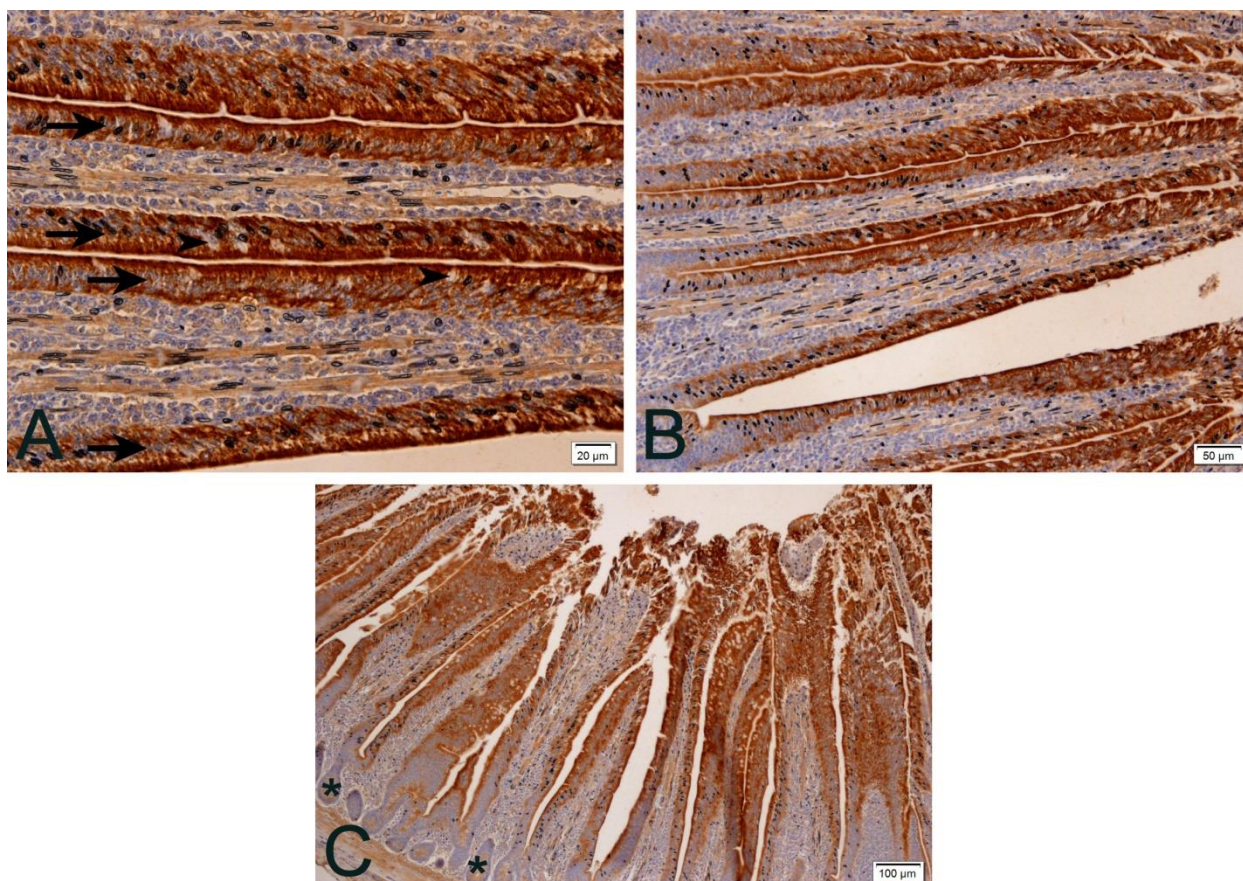


Figura 1- Fotomicrografias de imunohistoquímica a anti-calbindin-D28k em intestino de codornas de postura em diferentes aumentos. Observa-se o epitélio intestinal (setas) intensamente positivo ao anti-calbindin-D28k e células caliciformes (pontas de seta) não positivas (A e B). Observa-se também criptas (asterisco) não positivas ao anticorpo (C). Coloração cromógeno diaminobenzidina + hematoxilina.

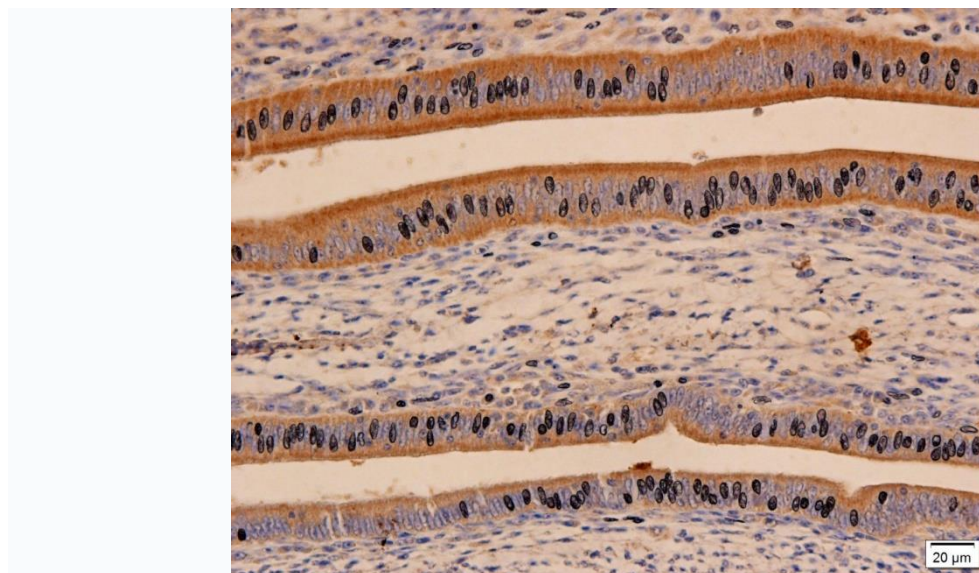


Figura 2- Fotomicrografia de imunohistoquímica a anti-calbindin-D28k em intestino de codornas de postura sob 28°C. Observa-se menor positividade epitelial quando comparado aos demais tratamentos de temperatura. Coloração cromógeno diaminobenzidina + hematoxilina.

O estresse por altas temperaturas afeta negativamente a performance das poedeiras, diminuindo o consumo, o ganho de peso vivo e a eficiência [48,49], inclusive a produção de ovos e a qualidade e a espessura da casca do ovo [50-53]. As últimas consequências citadas são advindas da diminuição da disponibilidade de íons de cálcio [53]. Importante frisar que o aumento de cálcio na dieta não melhora a qualidade da casca em condições de estresse por calor [54,55]. O estresse térmico por alta temperatura diminui a presença de calbindin-D28k no íleo, ceco, cólon, e útero de aves, causando deterioração da qualidade da casca do ovo sob essa condição [56]. Entretanto, no presente estudo observamos que o efeito no duodeno é o contrário, o estresse térmico diminui a positividade ao calbindin-D28k.

No presente estudo, os animais em temperaturas consideradas de maior conforto térmico para as codornas (24 e 28°C), apresentaram menor positividade do transportador celular de cálcio em seus epitélios duodenais, exatamente por se encontrarem em melhor conforto térmico, e não necessitarem maior absorção de cálcio (Figura 2). A literatura traz estudos [57] que demonstram que quanto maior a temperatura ambiental e o estresse térmico, maior a necessidade de suplementar cálcio da dieta, visto que os animais necessitarão de mais cálcio para seu metabolismo, uma vez que o estresse térmico diminui a disponibilidade do

cálcio [53]. Dentro dos tratamentos com 24 e 28°C, a suplementação com metionina proporcionou uma positividade ainda menor para o anti-calbindin-k28D quando comparado aos níveis normais. A expressão gênica desse mesmo gene seguiu um modelo semelhante em valores brutos, entretanto, tais resultados não foram significativos (Figura 6), talvez pelo pequeno número amostral e/ou pelo grande desvio padrão. Outro fato semelhante foi que a suplementação com metionina também fez a expressão gênica desse gene diminuir (Figura 6). Sendo assim, pressupõe que a suplementação por metionina deixe mais cálcio disponível, fato que possibilita a necessidade de menor absorção de cálcio a nível intestinal.

A maior positividade se deu na temperatura de estresse térmico (32°C), quando se imagine que tenha menos cálcio disponível, que aumenta a necessidade de cálcio. Dessa forma houve mais transportadores de cálcio (calbindin-k28D) (maior positividade), para proporcionar maior absorção para manter a produção. A positividade na temperatura de 20°C é intermediária, pois para codornas, tal temperatura já é relativamente baixa, sendo assim, o animal já sente algum resultado do estresse térmico, nesse caso por baixa temperatura, modificando sua fisiologia, e necessitando também de mais cálcio. Dessa forma explica-se a positividade levemente superior em 20°C à encontrada nos tratamentos de 24 e 28°C.

Esse é o primeiro estudo que cita a expressão proteica do calbindin-d28k no intestino de codornas de postura, além de também ser o primeiro a demonstrar a influência do estresse térmico por alta temperatura nesse transportador de cálcio.

Rim

Calbindin existe em 2 formas principais, com baixo peso molecular, uma proteína de 9kDa (Calbindin-D9k) presente em intestinos de mamíferos, e outra com alto peso molecular com 28kDa (Calbindin-D28k), presente no rim de aves [20,42] e rim de mamíferos [20]. No presente estudo foi encontrado positividade ao anti-calbindin-d28k nos túbulos contorcidos distais (TCD) dos néfrons, porém praticamente não há positividade nos túbulos proximais. Tal positividade nos TCD foi intensa na região circundante à grandes vasos sanguíneos renais (Figura 3). O corpúsculo renal, assim como, o glomérulo (capilares), não foram positivos ao anti-calbindin-d28k.

A positividade ao calbindin-d28k foi maior nos TCDs, pois são esses os sítios de maior reabsorção de minerais, entre eles o cálcio [58]. O túbulo contorcido proximal (TCP) apresentou pouca positividade por não reabsorver esse mineral normalmente, e no corpúsculo

renal não há positividade, pois tal porção do néfron não faz absorção ou reabsorção, apenas a filtração do sangue resultando na pré-urina.

As áreas mais positivas ao anticorpo foram exatamente as áreas de TCD ao redor de grandes vasos no córtex renal. Tal característica pode ser explicada, por essas áreas apresentarem sangue com maior quantidade de cálcio, os quais ainda não foram reabsorvidos.

A positividade é menor nas temperaturas 24 e 28°C, quando comparada à temperatura de 20 e 32°C. No tratamento a 32°C, aumentou a quantidade de TCD positivos, sempre em maior número perto das grandes veias renais (Figura 3). Nas temperaturas de 28 e 32°C, os TCD ficaram mais positivos quando comparados aos das temperaturas anteriores.

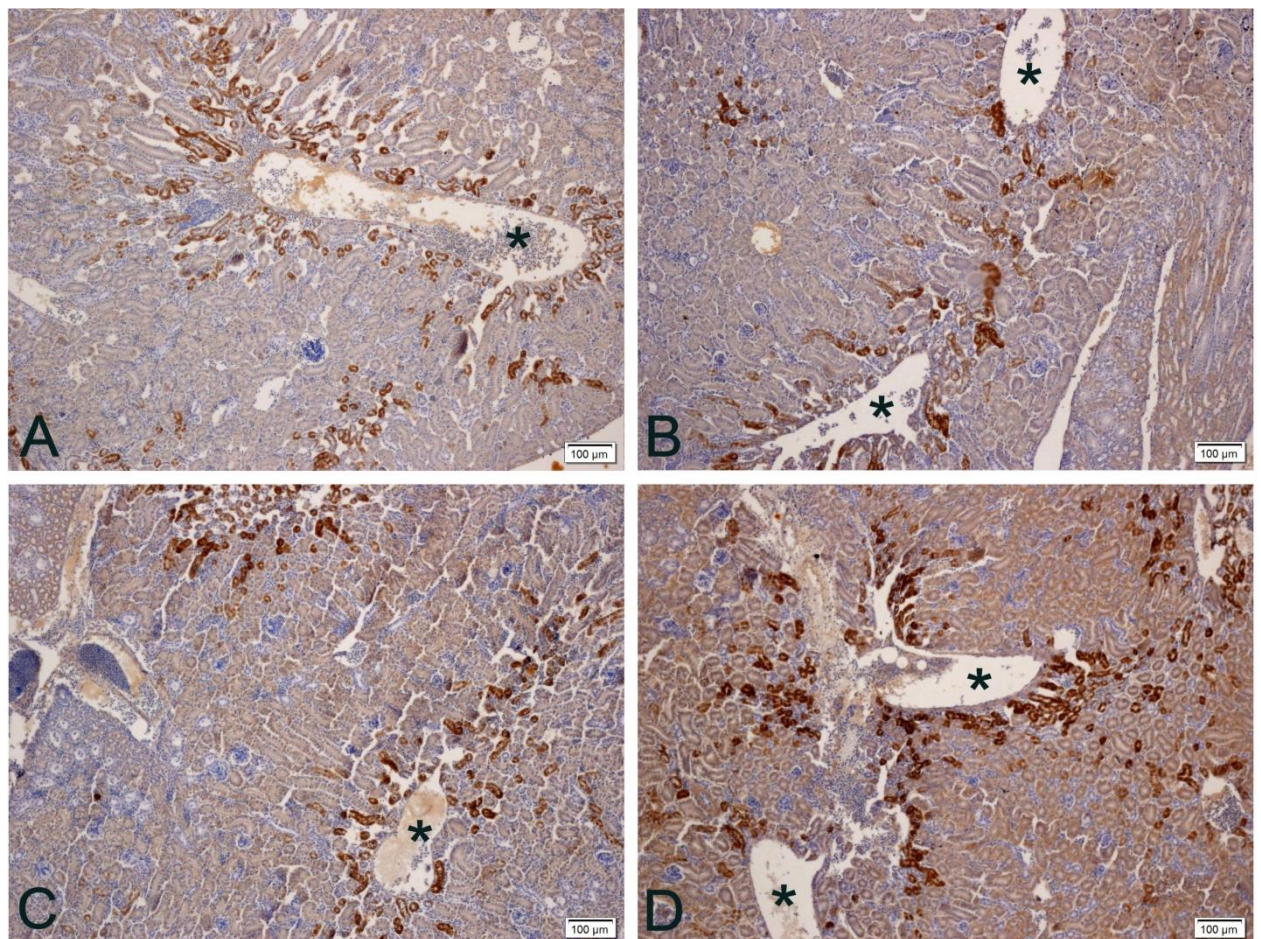


Figura 3- Fotomicrografias de imunoistoquímica a anti-calbindin-D28k em rim de codornas de postura em diferentes temperaturas. A) 20°C: A positividade se dá principalmente em túbulos contorcidos distais próximos á grandes vasos (asteriscos). B e C) 24 e 28°C: Menor positividade ao anticorpo. D) 32°C: Há mais túbulos contorcidos distais positivos e túbulos contorcidos proximais um pouco positivos também. Observa-se mais positividade (coloração marrom) nas temperaturas 20 e 32°C. Coloração cromógeno diaminobenzidina + hematoxilina. Aumento de 100x.

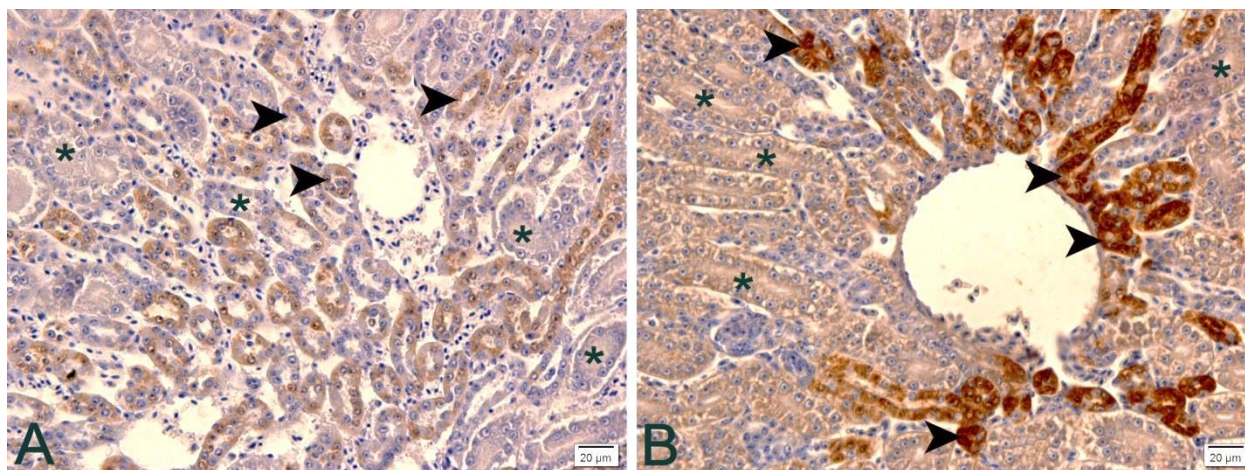


Figura 4- Fotomicrografias de imunoistoquímica de anti-calbindin-D28k em rim de cordornas de postura em diferentes temperaturas. A) 24°C: Observar pouca positividade nos túbulos contorcidos distais (pontas de seta) e não positividade nos túbulos contorcidos proximais (asteriscos). B) 32°C: Em estresse térmico observa-se intensa positividade dos túbulos contorcidos distais (pontas de seta) e pouca intensidade nos túbulos contorcidos proximais (asteriscos). Coloração cromógeno diaminobenzidina + hematoxilina. Aumento de 400x.

Nos tratamentos teoricamente na qual os animais estão em maior conforto térmico, ou seja, nos tratamentos 24 e 28°C, a positividade ao anti-calbindin-d28k foi menor. Uma vez que o estresse por altas temperaturas afeta negativamente a performance das poedeiras [48,49] devido a diminuição da disponibilidade de íons de cálcio [53], é de se esperar que a taxa de reabsorção a nível renal tenha que aumentar sob estresse. Dessa forma, animais em conforto térmico apresentariam menor necessidade de reabsorver grandes quantidades de cálcio, como ocorreu nos tratamentos com 24 e 28°C (menor positividade). Já em animais com algum grau de estresse térmico como 32°C (alta temperatura) e 20°C, teoricamente por se tratar de uma temperatura abaixo do conforto térmico para a espécie, apresentariam maior necessidade de reabsorver mais cálcio (maior positividade).

Apesar de ser de conhecimento que o estresse térmico por alta temperatura, diminui a presença de calbindin-D28k no íleo, ceco, cólon, e útero de aves, causando deterioração da qualidade da casca do ovo sob essa condição [56], não havia informação na literatura sobre a influência desse transportador de cálcio a nível renal, nem em estresse térmico por altas temperaturas, nem por baixa, como parece ocorrer na temperatura de 20°C. Sendo assim, esse é o primeiro relato sobre a influência do estresse térmico sobre tal transportador no rim, que assim como o intestino, tem efeito contrário ao achado para outros órgãos em outros experimentos com poedeiras [56].

No caso do tratamento sob estresse térmico por alta temperatura, mais TCD foram positivos ao anti-calbindin-d28k, isso demonstra que sob tal situação, mesmo o aumento da positividade, não foi suficiente para conseguir reabsorver o cálcio necessário para a produção

dessas aves. Precisando, além do aumento da expressão desse transportador, também o aumento no número de TCD que expressavam tal transportador (Figura 4).

O mais intrigante, foi que nas duas temperaturas mais altas (28 e 32°C) também aumentou a positividade de TCP, sendo assim, parece que o animal se adapta fisiologicamente a reabsorver cálcio, não só pelo TCD, mas também pelo TCP, em caso de estresse por altas temperaturas.

A suplementação por metionina parece não alterar a expressão proteica do transportador de cálcio calbindin-d28k. Sendo assim, tal suplementação não melhoraria o aproveitamento do cálcio em animais sob condições de estresse térmico.

Útero

A positividade ao anti-calbindin-D28K foi alta nas glândulas uterínicas, uma vez que esses são os sítios de produção e secreção do carbonato de cálcio. O mesmo é produzido e liberado para a produção da casca de ovo no útero, sendo tal produção influenciada pelo aumento do estrógeno circulante [46], e modulando a produção e qualidade da casca do ovo. As células das glândulas uterínicas, transportam o cálcio da sua porção basal até a superfície apical durante a produção do carbonato de cálcio, quanto mais carbonato de cálcio, mais rápida pode ser a produção de ovos e/ou a qualidade da casca do ovo. O epitélio (pseudo-estratificado ciliado) não é positivo ao anti-calbindin-D28k, exceto uma fina camada na porção apical desse epitélio.

O padrão de positividade foi maior nas temperaturas de 24 e 28°C, menor no tratamento na qual os animais foram submetidos à temperatura de 32°C e intermediária com 20° (Figura 5). A suplementação com metionina em 120% proporcionou aumento da positividade ao anti-calbindin-D28k.

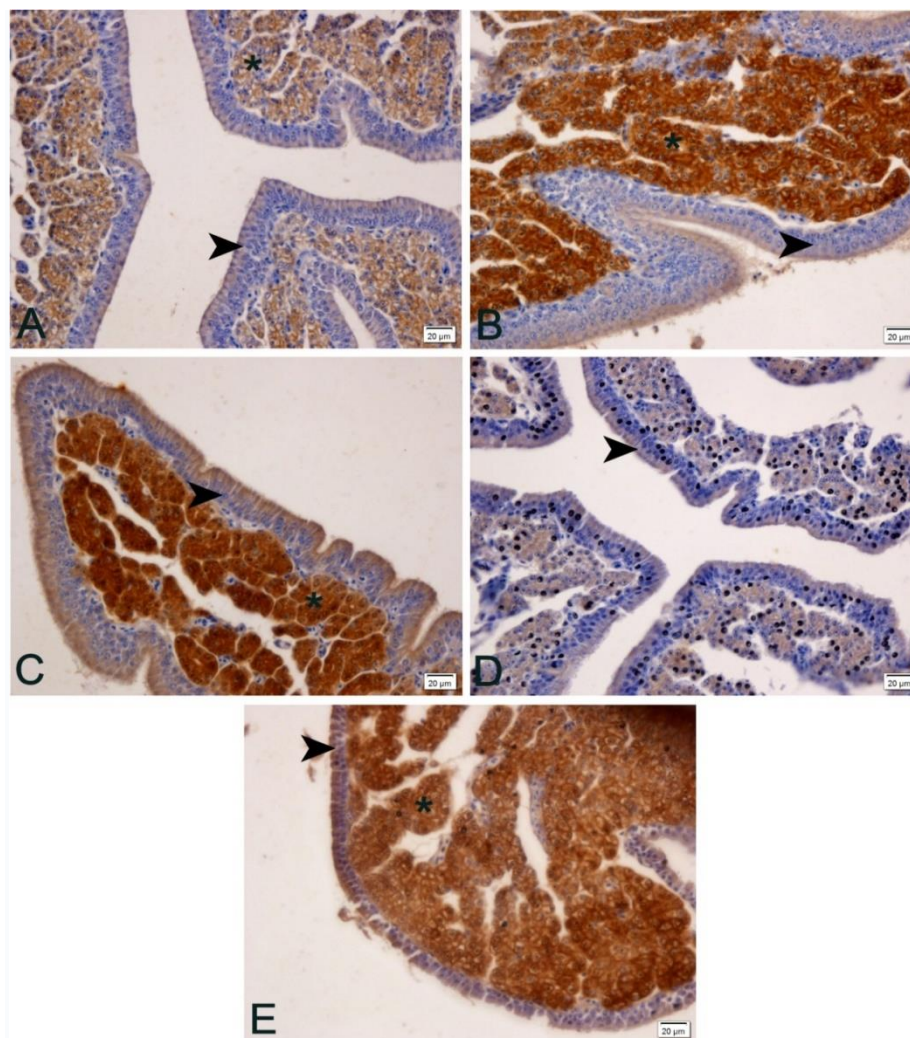


Figura 5- Fotomicrografias de imunistoquímica a anti-calbindin-D28k em útero de codornas de postura em diferentes temperaturas (20, 24, 28 e 32°C) e suplementada com 120% de metionina em 32°C. A) 20°C: observar menor positividade nas glândulas uterínicas (asterisco). B) 24°C: observar maior positividade nas glândulas uterínicas (asterisco). C) 28°C: observar maior positividade nas glândulas uterínicas (asterisco). D) 32°C: observar menor positividade nas glândulas uterínicas (asterisco). E) 32°C: suplementado com 120% de metionina. Observa-se mais positivo que o tratamento sem suplementação com metionina. Pontas de seta (epitélio uterínico), asteriscos (glândulas uterínicas). Coloração cromógeno DAB + hematoxilina. Aumento de 400x.

Ebeid et al. [56] citam que em condições por estresse por alta temperatura há diminuição da presença do calbindin-D28K no útero de galinhas poedeiras, o que corrobora o presente estudo, na qual a positividade ao anti-calbindin-D28K foi menor em 32°C. Essa é a primeira vez que esse fato é observado em codornas. O estresse por altas temperaturas já é conhecido por afetar negativamente a performance das poedeiras [48,49] devido a diminuição da disponibilidade de íons de cálcio [53]. Tal fato pode ser explicado pelo estresse por calor reduzir a conversão da vitamina D3 em sua forma metabolicamente ativa, a 1,25 (OH)2D3,

que é essencial para a absorção e a utilização de cálcio. De fato, a exigência de cálcio para poedeiras aumenta com altas temperaturas ambientais [57].

A suplementação por metionina em altas temperaturas (32°C) promoveu o aumento da positividade nas glândulas uterínicas (Figura 5) revertendo em partes, o efeito deletério do estresse térmico. O aumento da positividade desse transportador em condições de estresse térmico aumentou, possivelmente, a excreção de carbonato de cálcio das glândulas uterínicas para a produção da casca do ovo, melhorando a qualidade de ovos, apesar de não chegar aos valores de conforto térmico (Tabela 4). Diante desses fatos, a suplementação de metionina em condições de estresse térmico é recomendada.

O fato da positividade no tratamento de 20°C ser intermediária, demonstra que talvez para codornas, aves a qual tem grande resistência ao calor, tal temperatura já seja abaixo da ideal para as mesmas.

PCR EM TEMPO REAL (QPCR) PARA TRPV6 E CALBINDIN-D28K

O TRPV6 atua como um canal epitelial de cálcio em órgãos e glândulas que são caracterizadas pela alta demanda de transporte de cálcio [58-60]. De acordo com alguns estudos [61,62], tal canal iônico exerce efeito facilitador na entrada do cálcio em células epiteliais, sendo expresso nos epitélios de absorção e reabsorção, de intestino e rim, mas ainda havendo pouca informação sobre seu padrão de expressão em galinhas de postura [19], e nenhuma em codornas de postura. O calbindin por sua vez, já foi descrito em estudos, nas suas duas formas principais, o Calbindin-D9k (proteína de baixo peso molecular) presente no intestino de mamíferos e Calbindin-D28k (proteína de alto peso molecular) presente no rim, cérebro e intestino e úteros de aves [20,42] e rim de mamíferos [20].

A expressão gênica de Calbindin-D28k (Figura 6) no rim de codornas de postura sem a suplementação por metionina foi maior em 28°C, temperatura ainda dentro da termoneutralidade. Já, com suplementação por metionina, a maior expressão foi com 24°C. Ao comparar a expressão desse transportador dentro de cada temperatura (suplementado e não por metionina), vemos que a suplementação de metionina apenas aumenta a expressão gênica do Calbindin-D28k na temperatura de 24°C (termoneutralidade), ou seja, ao suplementar metionina podemos maximizar a reabsorção de cálcio a nível renal, o que pode aumentar a produção de ovos, por produzir uma casca de ovo em menos tempo e com maior espessura. Entretanto, em condições de estresse térmico, a suplementação não é eficaz para reduzir os efeitos deletérios do calor, pelo menos para esse gene a nível renal.

Para o gene do canal iônico TRPV6 no mesmo órgão, a maior expressão gênica em animais sem suplementação, ocorreu na temperatura de 20°C, já citada como temperatura abaixo do conforto térmico para codornas de postura. Em animais submetidos à suplementação com metionina, o maior pico da expressão gênica ocorreu na temperatura de 24°C (termoneutra), coincidindo com o resultado obtido no gene calbindin, seguido da temperatura de 32°C. Diferentemente do que aconteceu com o calbindin, ao fazer a comparação dentro de cada temperatura (suplementados e não), vemos que a suplementação com metionina aumentou a expressão gênica de TRPV6, não apenas em 24°C, mas também em 32°C, ou seja, em condições de estresse térmico. Tal resultado demonstra fisiologicamente e valida tecnicamente o uso da suplementação da metionina para codornas de postura em casos de estresse térmico, sendo eficaz na minimização dos efeitos deletérios da alta temperatura. Tal aumento desse gene aumenta a reabsorção de cálcio, disponibilizando mais mineral para ser utilizado na produção de ovos, especificamente na liberação pelo útero para produção da casca do ovo.

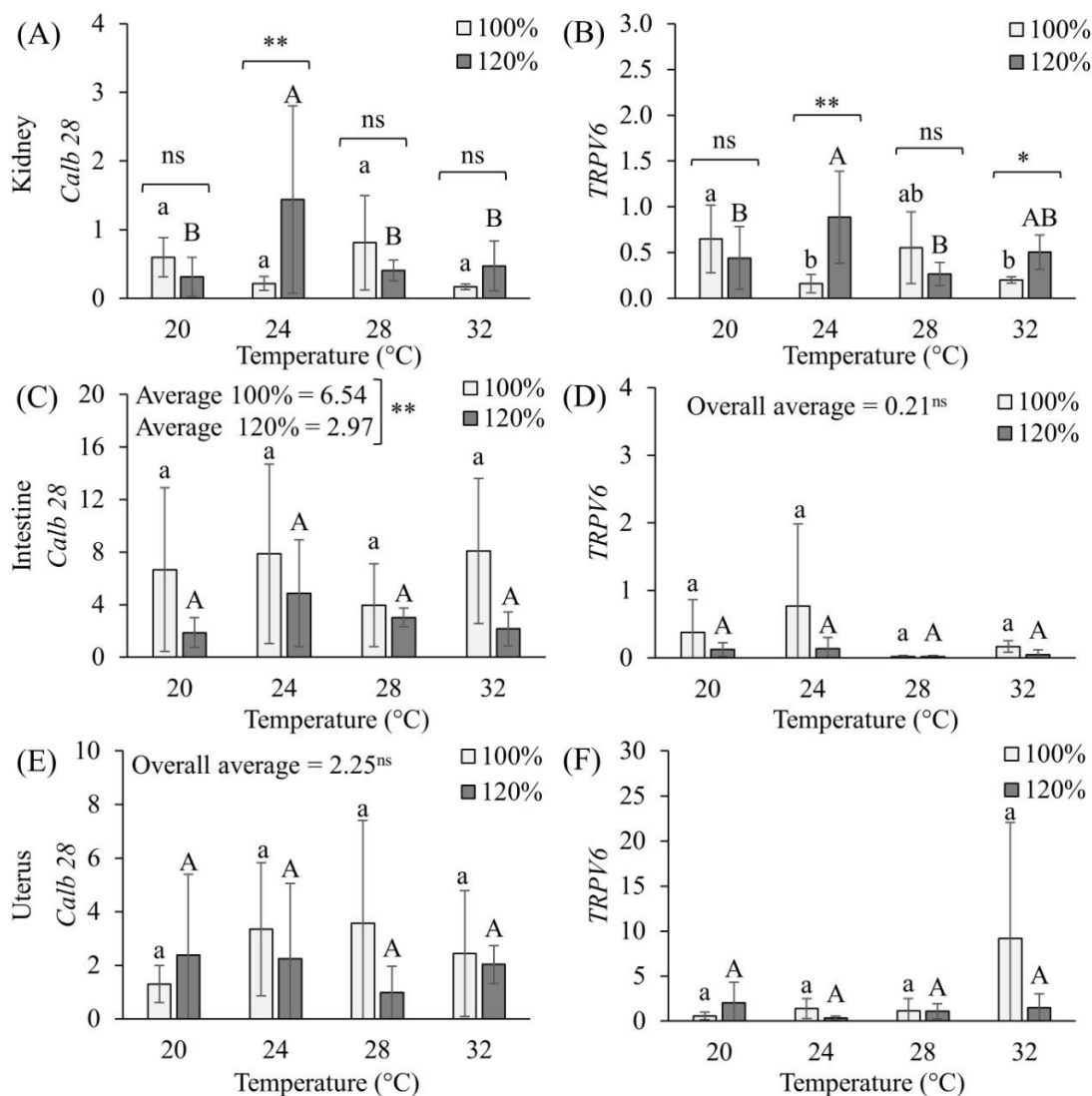


Figura 6. Gráficos dos efeitos da suplementação com metionina (100% e 120%) em diferentes temperaturas nas expressões dos genes *Calb 28* (A) e *TRPV6* (B) nos rins, *Calb 28* (C) e *TRPV6* (D) no intestino e *Calb 28* (E) e *TRPV6* (F) no útero de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) em fase de produção.

^{a,b,A,B} Médias seguidas de mesma letra minúsculas para suplementação 100% e maiúsculas para suplementação 120% não diferem entre si pelo teste de SNK em até 5% de probabilidade de erro; **, * e ns Indicam, respectivamente, diferenças significativas em até 1%, até 5% e não significativo pelo teste F.

Tais resultados corroboram estudos que já citaram a expressão gênica de ambos os genes (*TRPV6* e *Calbindin-D28k*) em tecido renal de aves [20,42], e ainda se destaca por ser o primeiro a demonstrar a positividade da expressão gênica dos mesmos, nos rins de codornas de postura.

No intestino houve expressão gênica para ambos os genes, em todos os tratamentos, corroborando outro estudo no tocante a presença de calbindin-D28k em poedeiras [63]. Esse é também o primeiro estudo a demonstrar a expressão gênica do *TRPV6* em intestino de codornas de postura. Entretanto, não foi possível observar alteração gênica da *Calbindin-D28k* ou da *TRPV6* com o aumento da temperatura, nem com a suplementação com

metionina. Tais resultados implicam em dizer que não há alteração na absorção nem no transporte celular de cálcio quando do estresse térmico, tão pouco há melhora com a suplementação de metionina.

O gene TRPV6 quando comparado ao calbindin, demonstrou em todos os tratamentos no tecido intestinal pouca expressividade, entretanto, contrariando e preenchendo a lacuna colocada por alguns autores [42,63-64], que afirmam ainda ser incerta a presença de TRPV6 em tecidos de aves, incluindo poedeiras ou codornas. Apesar da diferença não ser significativa devido ao alto desvio padrão, altas temperaturas pareceram diminuir a expressão gênica do TRPV6 a nível intestinal.

Para tecido uterínico, a expressão gênica de Calbindin-D28K e TRPV6 também ocorreu em todos os tratamentos, e assim como para intestino, foi pouca para TRPV6. O aumento da temperatura e a suplementação com metionina não influenciaram a expressão gênica de calbindin-D28k ou de TRPV6. Dessa forma, o tecido uterínico também não é alterado nessas condições, não justificando nesse caso a utilização da suplementação de metionina.

Os resultados descritos e observados neste presente trabalho evidenciam a expressão gênica dos genes TRPV6 e Calbindin-D28k, nos tecidos renal, intestinal e uterinos de codornas de postura. Corroborando estudos realizados em poedeiras [45-47] indicando que a calbindin-D28k modularia a capacidade absorptiva intestinal de cálcio e de deposição do mesmo no útero, influenciando na produção e na qualidade da casca do ovo, como também a presença significativa de TRPV6 (proteína e RNAm) no intestino e rim de poedeiras [19].

Foi possível verificar através da análise de variância a interação entre temperatura e suplementação para os dois genes no rim ($p \leq 0,01$), de suplementação para calbindin-D28k em intestino ($p \leq 0,01$) e de temperatura para TRPV6 em útero (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da Análise de Variância (Quadrados médios) para os efeitos de diferentes temperaturas e suplementação com metionina (100% e 120%) nas expressões dos genes *Calb 28* e *TRPV6* nos rins, intestino e útero de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) em fase de produção

Fonte de variação	Gl	Rim		Intestino		Utero	
		<i>Calb 28</i>	<i>TRPV6</i>	<i>Calb 28</i>	<i>TRPV6</i>	<i>Calb 28</i>	<i>TRPV6</i>
Temperatura	3	0,63ns	0,12ns	22,85ns	0,54ns	2,29ns	61,66*
Suplementação	1	0,62ns	0,26ns	197,63**	0,93ns	8,36ns	45,33ns
Temp. vs Suplem.	3	2,00**	0,79**	16,57ns	0,29ns	9,22ns	54,33ns

*, **, e ns Indicam, respectivamente, diferenças significativas em até 5%, até 1% e não significativo pelo teste F.

Em adição, as respostas do calbindin-D28k e TRPV6 nos rins, intestino e útero de codornas japonesas sob suplementação com metionina + cistina (100% e 120%) em diferentes temperaturas, observou-se uma forte correlação positiva ($r = 0,90^*$) nos rins e moderada positiva (r

= 0,69*) no intestino entre as expressões dos genes *Calb 28* e *TRPV6* (Figura 7), indicando que ambos calbindin-D28k e TRPV6 (RNAm) atuam sinergicamente, modulando a capacidade reabsortiva (rim) e absorptiva (intestino) e subsequente deposição do cálcio pelo útero. As correlações entre as demais variáveis foram fracas e não significativas.

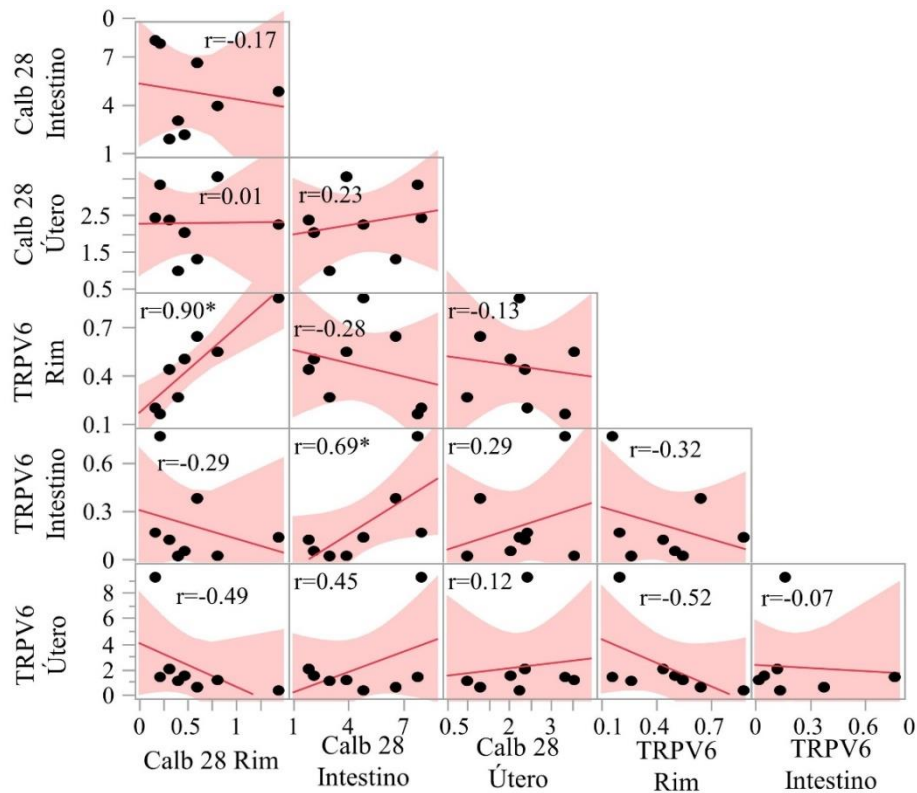


Figura 7. Correlação de Pearson para as variações nas expressões dos genes *Calb 28* e *TRPV6* nos rim, intestino e útero de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) suplementadas com metionina (100% e 120%) em diferentes temperaturas em fase de produção.

CONCLUSÃO

Esse estudo traz pela primeira vez variações histomorfológicas e de expressão (mRNA e proteína) de TRPV6 e Calbindin-D28k em órgãos envolvidos com a absorção, reabsorção e deposição de cálcio em codornas. Ainda justifica fisiologicamente a utilização da suplementação por metinona (120%), em estresse térmico, por diminuir o efeito deletério em parâmetros de intestino, rim e útero, além de melhorar outros, nos mesmos órgãos em situação de termoneutralidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro. 2016; 44: 29-31.
2. Pereira DF, Vale MM, Zevolli BR, Salgado DD. Estimating mortality in laying hens as the environmental temperature increases. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 2010; 12: 265-271.
3. Albino LFT, Carvalho BR, Maia RC, Barros VRSM. Galinhas Poedeiras: Criação e Alimentação. Viçosa, Minas Gerais: Aprenda Fácil. 2014. pp.376.
4. Carvalho LSS. Nutrição de poedeiras em clima quente. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 2012; 9(18).
5. Mello JF. Influência dos níveis de cálcio e fósforo na dieta de matrizes de codornas japonesas, no desempenho produtivo e no desenvolvimento ósseo embrionário da progênie. Maringá: UEM, 2015. 82p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá. 2015.
6. Nascimento DCN, Sakomura NK, Siqueira JC. Exigências de metionina + cistina digestível para aves de corte ISA Label criadas em semiconfinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2009; 38(5): 869-878.
7. Virden WS, Kidd MT. Estresse fisiológico em frangos de corte: Ramificações na digestibilidade e respostas de nutrientes. *Journal of Applied Poultry Research*. 2009; 18(2): 338-347.
8. Alagawany M, Farag MR, El-Hack MA & Patra A. Heat stress: effects on productive and reproductive performance of quail. *World's Poult Sci J*. 2017; 73(4): 747-756.
9. D'Mello JPF. Amino Acids in Animal Nutrition. Formerly of the Scottish Agricultural College Edinburgh, 2ª ed. UK. 2003; 143.
10. Klasing KC. Comparative Avian Nutrition. Davis: Cab international. 1998. pp.350.
11. Summers JD, Atkinson JL, Spratt D. Supplementation of a low protein diet in an attempt to optimize egg mass output. *Can. J. Anim. Sci*. 1991; 71: 211-220.

12. Harm RH, Russell GB. Optimizing egg mass with amino acid supplementation of a low-protein diet. *Poult. Sci.* 1993; 72: 1892-1896.
13. Bunchasak C, et al. The effects of supplementing methionine plus cystine to a low-protein diet on the growth performance and fat accumulation of growing broiler chicks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 1997; 10(2): 185-191.
14. Bunchasak C, Silapasorn T. Effects of adding methionine in low-protein diet on production performance, reproductive organs and chemical liver composition of laying hens under tropical conditions. *International Journal of Poultry Science.* 2005; 4 (5): 301-308.
15. Júnior JPF. Níveis de metionina+cistina digestíveis para aves de reposição leves nas fases inicial e cria. Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, PDIZ, CCA, UFPB, Areia, PB. 2013.
16. Lopes GM. Biodisponibilidade relativa e níveis de metionina para frangos de corte. Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, PDIZ, CCA, UFPB, Areia, PB. 2014.
17. Pinheiro SG. Relação energia metabolizável: aminoácidos sulfurosos para aves leves. Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, PDIZ, CCA, UFPB, Areia, PB. 2014.
18. Santana MHM. Níveis de metionina+cistina para galinhas poedeiras leves nas fases de recria e postura. Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, PDIZ, CCA, UFPB, Areia, PB. 2014.
19. Yang JH, Hou JF, Farquharson C, Zhou ZL, Deng YF, Wang L, Yu Y. Localisation and expression of TRPV6 in all intestinal segments and kidney of laying hens. *British Poultry Science.* 2011; 52(4): 507-516.
20. Fleet James C, Schoch Ryan D. Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Critical reviews in clinical laboratory sciences.* 2010; 47(4): 181-195.
21. Ramos AH, Santos LM, Miglino MA, Peres JA, Guerra R R. Biometria, histologia e morfometria do sistema digestório do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre. *Biotemas.* 2011; 24(4): 111-119.

22. Ishak K, et al. Gradação histológica e estadiamento da hepatite crônica. *Journal of hepatology*. 1995; 22(6): 696-699.
23. PFAFFL, Michael W. Um novo modelo matemático para quantificação relativa em RT-PCR em tempo real. *Pesquisa de ácidos nucleicos*. 2001; 29(9): e45-e45.
24. Cody R. *An Introduction to SAS University Edition*. Cary. NC. SAS Institute. 2015. pp.366.
25. Mitchell MA, Carlisle AJ. The effects of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol. A*. 1992; 101: 137-142.
26. Lin H, Jeao HC, Buyse J, Decuypere E. Strategies for preventing heat stress in Poultry. *World's Poultry Science Journal*, Ithaca. 2006; 62(1): 71-86.
27. Marchini CFP, et al . Morfometria da mucosa duodenal em frangos de corte submetidos à temperatura ambiente cíclica elevada. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte. Apr. 2009; 61(2): 491-497.
28. Araújo LF, et al. Utilização de levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) para leitões na fase inicial. *Ciência Rural*. 2006; 36(5): 156-1581.
29. Santos RR, Awati A, Roubos-Van Den Hil PJ, Tersteeg-Zijderveld MH, Koolmees PA, Fink-Gremmels J. Quantitative histo-morphometric analysis of heat-stress-related damage in the small intestines of broiler chickens. *Avian Pathology*. 2015; 44(1): 19-22.
30. Wu, Q.J.; Liu, N.; Wu, X.H.; Wang, G.Y.; Lin, L. Glutamine alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, intestinal inflammatory response, and barrier integrity in broilers. *Poultry Science*. 2018; 97(8): 2675-2683.
31. Furlan RL, Macari M & Luquetti BC. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. *Anais 5º Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição, Balneário Camboriú, Santa Catarina*. 2004. p.6-28.
32. Sandikci M, Eren U, Onol AG, Kum S. The effect of heat stress and the use of *Saccharomyces cerevisiae* or (and) bacitracin zinc against heat stress on the intestinal mucosa in quails. *Revista Medicina Veterinária*. 2004; 155(11): 552-556.

33. Mehaisen GM, Ibrahim RM, Desoky AA, Safaa HM, El-Sayed OA, Abass AO. The importance of propolis in alleviating the negative physiological effects of heat stress in quail chicks. *PloS One*. 2017; 12(10): e0186907.
34. Nyoni NMB, Grab S & Arche ERM. Heat stress and chickens: climate risk effects on rural poultry farming in low-income countries. *Clim. Dev.* 2018. pp.1-8.
35. Figueiredo DF, et al. Desempenho e Morfometria da Mucosa de Duodeno de Frangos de Corte Alimentados com Farelo de Canola, Durante o Período Inicial. *R. Bras. Zootec.* 2003; 32(6): 1321-1329.
36. Lana GRQ, Rostagno HS, Albino LFT, Lana AMQ. Efeito da temperatura ambiente e da restrição alimentar sobre o desempenho e a composição da carcaça de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2000; 29: 1117-1123.
37. Rosa PS. Desempenho e concentrações de alguns componentes do metabolismo intermediário de frangos com potencial de crescimento diferenciado submetidos ao estresse por calor. 2005.
38. Plavnik I, Yahav S. Efeito da temperatura ambiente em frangos submetidos a restrição de crescimento em idade precoce. *Avicultura*. 1998; 77(6): 870-872.
39. Miller SC. Calcium homeostasis and mineral turnover in the laying hen. In: Whittlehead, C.C., (Eds.), *Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry*, Chapter 7. Abingdon, Carfax. jenhuis, T., Hoenderop, J. 1992.
40. Sugiyama T, Kusuhara S. Avian calcium metabolism and bone function. *Asial-Austral. J. Anim. Sci.* 2001; 14: 82–90.
41. Sugiyama T, Kikuchi H, Hiyama S, Nishizawa K, Kusuhara S. Expression and localisation of calbindin D28k in all intestinal segments of the laying hen. *Br Poult Sci*. 2007; 48(2): 233-8.
42. Bar A. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 2008; 152, 447–469.
43. Fullmer CS et al. A purificação da proteína de ligação ao cálcio do útero da galinha poedeira. *Anais da Sociedade de Biologia Experimental e Medicina*. 1976; 152(2): 237-241.

44. Parmentier M. Calbindin D28k is essentially located in the colonic part of the toad intestine. *Bit/Cell*. 1990; 68: 43-49
45. Saki AA, Tivey DR. Immunohistochemical detection of calbindin D28k and oestrogen receptor in the small intestine of pre – and post – lay hens. *Proc. Aust. Poult. Sci.* 1997; 9.
46. Corradino RA, Smith CA, Krook LP, Fullmer CS. Tissue-specific regulation of shell gland calbindin D28K biosynthesis by estradiol in precociously matured, vitamin D-depleted chicks. *Endocrinology*. 1993; 132(1): 193-8.
47. Wu JC, Smith MW, Mitchell MA, Peacock MA, Turvey A, Keable SJ. Enterocyte expression of calbindin, calbindin mRNA and calcium transport increases in jejunal tissue during onset of egg production in the fowl (*Gallus domesticus*). *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*. 1993; 106(2): 263-9.
48. Donkoh A. Ambient temperature: a factor affecting performance and physiological response of broiler chickens. *Int. J. Biometeorol.* 1989; 33: 259-265.
49. Siegel HS. Stress, strains and resistance. *Br. Poult. Sci.* 1995; 36: 3-22.
50. Deaton JW, Reece FN, Mcnaughton JL, Lott BD. Effect of differing temperature cycles on egg shell quality and layer performance. *Poult. Sci.* 1981; 60: 733-737.
51. Emery DA, Vohra D, Ernst RA. The effect of cycle and constant ambient temperature on feed consumption, egg production, egg weight, and shell thickness of hens. *Poult. Sci.* 1984; 63: 2027-2035.
52. Campos EJ. *Avicultura: razões, fatos e divergências*. Editora FEPMVZ: Belo Horizonte – MG. 2000.
53. Mack LA, Felver-Gant JN, Dennis RL. Genetic variations alter production and behavioral responses following heat stress in two strains of laying hens. *Poultry Science*. 2013; 92: 285-294.
54. De Andrade AN, Rogler JC, Featherston WR, Alliston CW. Interrelationships between diet and elevated temperatures (cyclic and constant) on egg production and shell quality. *Poult. Sci.* 1977; 56: 1178-1188.

55. Tanor MA, Lesson S, Summers JD. Effect of heat stress and diet composition on performance of white leghorn hens. *Poult. Sci.* 1984; 63: 304-310.
56. Ebeid TA, Suzuki T, Sugiyama T. High ambient temperature influences eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments of laying hens. *Poult Sci.* 2012; 91(9): 2282-7.
57. Plavnik I. Nutrição de aves em climas quentes. In: Conferência Apinco. 2003. pp. 235-245.
58. Christakos S, et al. Vitamina D e absorção intestinal de cálcio. *Endocrinologia Molecular e Celular.* 2011; 347(1-2): 25-29.
59. Nijenhuis T, Hoenderop JG, Van Der KAW, Bindels RJ. Localization and regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14: 2731–2740.
60. Hoenderop Joost GJ, Nilius Bernd, Bindels René JM. Calcium absorption across epithelia. *Physiological reviews.* 2005; 85(1): 373-422.
61. Brown AJ, Krits I, Armbrrecht HJ. Effect of age, vitamin D, and calcium on the regulation of rat intestinal epithelial calcium channels. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2005; 437: 51–58.
62. Bianco Suzy DC, et al. Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene. *Journal of bone and mineral research.* 2007; 22(2): 274-285.
63. Wasserman RH, Taylor AN. Vitamin D-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science.* 1966; 152: 791–793.
64. Qin X, Klandorf H, Porter DW, Holt SB, Martin WG. Estrogen enhancement of calcium, magnesium, and calcium-magnesium stimulated adenosine triphosphatase activity in the chick shell gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1993b; 89: 4–10.